

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005257

International filing date: 23 March 2005 (23.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-084810
Filing date: 23 March 2004 (23.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 2 3 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 8 4 8 1 0

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
J P 2 0 0 4 - 0 8 4 8 1 0
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

出 願 人
Applicant(s): エーザイ株式会社

2 0 0 5 年 4 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願		
【整理番号】	EP04N00301		
【提出日】	平成16年 3月23日		
【あて先】	特許庁長官 殿		
【国際特許分類】	C12Q 1/42		
【発明者】			
【住所又は居所】	茨城県つくば市東光台5丁目1番地3	エーザイ株式会社	筑波
	研究所内		
【氏名】	岡本 淳		
【発明者】			
【住所又は居所】	茨城県つくば市東光台5丁目1番地3	エーザイ株式会社	筑波
	研究所内		
【氏名】	川村 高紀		
【発明者】			
【住所又は居所】	茨城県つくば市東光台5丁目1番地3	エーザイ株式会社	筑波
	研究所内		
【氏名】	浅野 誠		
【発明者】			
【住所又は居所】	茨城県つくば市東光台5丁目1番地3	エーザイ株式会社	筑波
	研究所内		
【氏名】	下窪 大哉		
【発明者】			
【住所又は居所】	茨城県つくば市東光台5丁目1番地3	エーザイ株式会社	筑波
	研究所内		
【氏名】	白戸 学		
【発明者】			
【住所又は居所】	茨城県つくば市東光台5丁目1番地3	エーザイ株式会社	筑波
	研究所内		
【氏名】	浅田 誠		
【特許出願人】			
【識別番号】	000000217		
【氏名又は名称】	エーザイ株式会社		
【代表者】	内藤 晴夫		
【手数料の表示】			
【予納台帳番号】	004983		
【納付金額】	21,000円		
【提出物件の目録】			
【物件名】	特許請求の範囲 1		
【物件名】	明細書 1		
【物件名】	図面 1		
【物件名】	要約書 1		

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、得られた非ヒト動物モデルにおける当該分泌タンパク質量を測定することを特徴とする、非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法。

【請求項 2】

分泌型タンパク質発現ベクターが、転写制御因子結合配列からなるポリヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

転写制御因子結合配列が、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7 または配列番号：8 で表される配列である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の測定方法によって、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法。

【請求項 5】

分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、得られた非ヒト動物モデルにおける当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標として、移植細胞数を測定する方法。

【請求項 6】

分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、得られた非ヒト動物モデルにおける当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標として、腫瘍体積を測定する方法。

【請求項 7】

分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、得られた非ヒト動物モデルにおける当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標として、移植細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングする方法。

【請求項 8】

分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、得られた非ヒト動物モデルにおける当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標として、腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法。

【請求項 9】

分泌型タンパク質発現ベクターが、恒常的転写制御配列からなるポリヌクレオチドを含む、請求項 5～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

恒常的転写制御配列が、配列番号：9 で表される配列である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

血中の分泌タンパク質量を測定することを特徴とする、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

分泌型タンパク質が、分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼである、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

導入細胞が、腫瘍細胞または不死化細胞である、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の測定方法に用いられることを特徴とする、分泌型タンパク質発現ベクター。

【請求項 15】

請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の測定方法に用いられることを特徴とする、分泌型

タンパク質発現ベクター導入細胞。

【請求項 16】

請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の測定方法に用いられることを特徴とする、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を移植した非ヒト動物。

【請求項 17】

請求項 14 に記載の分泌型タンパク質発現ベクターを含有する測定キット。

【請求項 18】

請求項 15 に記載の分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を含有する測定キット。

【請求項 19】

請求項 16 に記載の分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を移植した非ヒト動物を含有する測定キット。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 非ヒト動物モデルにおける転写活性測定方法およびこれを指標とした細胞数の測定方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、非ヒト動物モデルに移植した培養細胞における転写制御配列の転写活性および培養細胞の細胞数の非侵襲的かつ簡便な評価法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

転写を調節することにより蛋白質の発現量を調節することが、蛋白質の機能発現において重要な役割を果たしていることが知られている。この転写調節を制御することによる各種疾患の治療剤の開発が試みられている。そして、このような薬剤の開発には、転写活性を適切に評価する方法が不可欠である。これまで、培養細胞 (in vitro) における転写活性の測定方法は数多く報告されている。しかしながら、非ヒト動物モデル (in vivo) において、適切に転写活性を測定する方法はほとんど知られていない。

また、非ヒト動物モデルに移植した培養細胞の細胞数を測定することは、特に、抗腫瘍剤の開発において重要な役割を果たしている。しかしながら、非侵襲的かつ簡便に当該細胞数を測定する方法はほとんど知られていない。

【0003】

従来、非ヒト動物モデルにおいて、転写活性を測定する方法としては、ノザンブロットイングによるmRNAの発現解析 (非特許文献1) やレポーター遺伝子として β -Gal遺伝子を用いた方法 (非特許文献2) が用いられてきた。しかし、これらの方法は、mRNAを抽出したり、組織切片を作製したりするような煩雑な作業を伴うため処理能力が著しく低いという問題がある。また、転写活性の測定のために、組織を摘出する必要があるため、経時的な変化を調べることは困難である。

【0004】

また、近年、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いた方法が報告されている (非特許文献3)。しかし、この方法では、転写活性を測定するために、ルシフェラーゼ遺伝子を導入した培養細胞をマウスに移植し、当該マウスを麻酔した後にルシフェラーゼの基質を静脈内注射し、暗室内にてルシフェラーゼ活性による発光を撮影して画像解析する必要がある。

このため、この方法では、特殊な装置を必要とすること、上記のような煩雑な作業を伴うこと、麻酔の影響があること、定量性に欠けること等が問題となる。

【0005】

一方、非ヒト動物モデルに移植した培養細胞の細胞数を測定する方法としては、予め色素で染色した細胞を移植する方法 (非特許文献4) が用いられてきた。しかし、この方法は、組織を摘出するという煩雑な作業を伴うため処理能力が著しく低いという問題がある。また、組織を摘出する必要があるため、経時的な変化を調べることは困難である。さらには、移植した培養細胞が細胞分裂をするごとに色素が減少するため、測定感度に問題がある。

【0006】

また、非ヒト動物モデルに移植した培養細胞の細胞数を測定する手段としてレポーター遺伝子としてGFP遺伝子を用いた方法がAnti Cancer社から報告されている (非特許文献5)。この方法では、GFP遺伝子の5'上流に恒常的転写制御配列を連結したプラスミドを腫瘍細胞に導入し、当該腫瘍細胞をマウスに移植し、蛍光顕微鏡によって当該マウスの臓器を撮影し、画像解析することによって、細胞数を測定する。しかし、この方法では、当該マウスの内臓や脳などに移植した腫瘍細胞の細胞数を測定するためには、当該マウスを開腹または開頭して蛍光顕微鏡撮影する必要がある。このため、侵襲的かつ煩雑であり、また、麻酔の影響、定量性についても問題があった。

【非特許文献1】 Molecular Cloning, A Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring

【非特許文献2】Kucharczuk, et. al. (1999) Development 126(9): 1957-1965

【非特許文献3】Shoemaker. The 7th International Symposium on Cancer Chemotherapy, Tokyo, 2002

【非特許文献4】Yamagata, et. al. (2000) Journal of experimental & clinical cancer research, 19(2): 211-217

【非特許文献5】Yang, et. al. (1999) Cancer Research 59(4): 781-786

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その解決しようとする課題は、非ヒト動物モデルに移植した培養細胞における転写制御配列の転写活性の簡便かつ精度のよい評価方法および転写制御配列の転写活性に影響を与える化合物のスクリーニング方法ならびに非ヒト動物モデルに移植した培養細胞の移植細胞数または腫瘍体積を測定する方法および移植細胞数または腫瘍体積に影響を与える化合物の非侵襲的かつ簡便なスクリーニング方法を確立することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意検討を重ねた結果、分泌型に改変した胎盤由来アルカリフォスファターゼ（以下、PLAPと称する場合がある）遺伝子上流に転写制御配列を挿入しPLAPレポータープラスミドを作製し、このPLAPレポータープラスミドを導入した培養細胞を非ヒト動物モデルに移植して、当該非ヒト動物モデルの血中のPLAP活性を測定することにより、当該転写制御配列の転写活性を測定することに成功した。

【0009】

また、PLAPレポータープラスミドを導入した培養細胞を移植した非ヒト動物モデルに化合物を投与し、当該非ヒト動物モデルの血中のPLAP活性を測定することにより、非ヒト動物モデルにおいて、当該転写制御配列の転写活性に影響を与える化合物を非侵襲的かつ簡便にスクリーニングすることに成功した。

【0010】

さらに、当該転写制御配列として恒常的転写制御配列を用いて、PLAPレポータープラスミドを作製し、このPLAPレポータープラスミドを導入した培養細胞を非ヒト動物モデルに移植して、得られた非ヒト動物モデルの血中のPLAP活性を測定することにより、非ヒト動物モデルにおいて、培養細胞の細胞数または腫瘍体積を測定できることおよび移植細胞数または腫瘍体積に影響を与える化合物を非侵襲的かつ簡便にスクリーニングしうることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】

すなわち本発明は、以下に関する。

(1) 分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、得られた非ヒト動物モデルにおける当該分泌タンパク質量を測定することを特徴とする、非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法。

(2) 分泌型タンパク質発現ベクターが、転写制御因子結合配列からなるポリヌクレオチドを含む、(1)に記載の方法。

(3) 転写制御因子結合配列が、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7または配列番号：8で表される配列である、(2)に記載の方法。

(4) (1)～(3)のいずれか1項に記載の測定方法によって、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法。

(5) 分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、得られた非ヒト動物モデルにおける当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標として、移植細胞数を測定する方法。

(6) 分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、得られた非ヒト動物モデルにおける当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標として、腫瘍体積を測定する方法。

(7) 分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、得られた非ヒト動物モデルにおける当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標として、移植細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングする方法。

(8) 分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、得られた非ヒト動物モデルにおける当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標として、腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法。

(9) 分泌型タンパク質発現ベクターが、恒常的転写制御配列からなるポリヌクレオチドを含む、(5)～(8)のいずれか1項に記載の方法。

(10) 恒常的転写制御配列が、配列番号：9で表される配列である、(9)に記載の方法。

(11) 血中の分泌タンパク質量を測定することを特徴とする、(1)～(10)のいずれか1項に記載の方法。

(12) 分泌型タンパク質が、分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼである、(1)～(11)のいずれか1項に記載の方法。

(13) 導入細胞が、腫瘍細胞または不死化細胞である、(1)～(12)のいずれか1項に記載の方法。

(14) (1)～(13)のいずれか1項に記載の測定方法に用いられることを特徴とする、分泌型タンパク質発現ベクター。

(15) (1)～(13)のいずれか1項に記載の測定方法に用いられることを特徴とする、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞。

(16) (1)～(13)のいずれか1項に記載の測定方法に用いられることを特徴とする、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を移植した非ヒト動物。

(17) (14)に記載の分泌型タンパク質発現ベクターを含有する測定キット。

(18) (15)に記載の分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を含有する測定キット。

(19) (16)に記載の分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を移植した非ヒト動物を含有する測定キット。

【発明の効果】

【0012】

本発明により、非ヒト動物モデルに移植した培養細胞における転写制御配列の転写活性の簡便かつ精度のよい評価方法を確立し、定量的な評価を可能とした。

これにより、これまでの煩雑かつ定量性の低い評価方法では困難だった転写活性の経時的な変化を測定することも可能となった。

【0013】

また、本発明により、非ヒト動物モデルにおいて、移植した培養細胞における転写制御配列の転写活性に影響を与える化合物を非侵襲的かつ簡便にスクリーニングすることも可能となった。

【0014】

さらに、当該転写制御配列として恒常的転写制御配列を用いて、分泌型タンパク質発現ベクターを導入した培養細胞を非ヒト動物モデルに移植して、得られた非ヒト動物モデルの血中のタンパク質量を測定することにより、移植細胞数または腫瘍体積の測定および移植細胞数または腫瘍体積に影響を与える化合物を非侵襲的かつ簡便にスクリーニングすることが可能となった。

これにより、これまでの評価方法では困難だった、癌細胞同所移植モデルにおける腫瘍体積の経時的変化を評価することが可能となった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

以下に本発明の実施の形態について説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施の形態にのみ限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、さまざまな形態で実施をすることができる。

【0016】

1. 分泌型タンパク質

本発明において、分泌型タンパク質とは、細胞外に分泌されうるタンパク質であれば何でもよい。細胞外に分泌されるタンパク質としては、例えば、ペプチド性ホルモン、サイトカイン、アルブミン（例えば、血清アルブミン等）、グロブリン（例えば、免疫グロブリン等）、酵素、その他の分泌タンパク質などが挙げられる。

【0017】

ペプチド性ホルモンとしては、例えば、ナトリウム利尿ペプチド、視床下部ホルモン（例えば、オピオイドペプチド、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、性腺刺激ホルモン、ソマトスタチン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン放出因子、色素胞刺激ホルモン放出因子、色素胞刺激ホルモン放出抑制因子、プロラクチン放出因子、プロラクチン放出抑制因子、ヘッドアクチベーター等）、脳下垂体ホルモン（例えば、副腎皮質刺激ホルモン、成長ホルモン、プロラクチン、甲状腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、卵胞刺激ホルモン、色素胞刺激ホルモン、オキシトシン、バソプレシン等）、甲状腺ホルモン（例えば、カルシトニン等）、副甲状腺ホルモン、膵臓ホルモン（例えば、インシュリン、グルカゴン、膵臓ポリペプチド等）、消化管ホルモン（セクレチン、バソアクチブインテスティナルポリペプチド、ガストリックインヒビトリポリペプチド、ガストリン、ガストリン放出ペプチド、コレシストキニン、モチリン、セルレイン、ウログastroン等）、唾液腺ホルモン、胎盤性ホルモン（例えば、じゅう毛性性腺刺激ホルモン、胎盤性ラクトゲン等）、卵巣ホルモン、成長因子（例えば、上皮細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、エリスロポエチン、血管内皮細胞増殖因子、インシュリン様成長因子、神経成長因子、骨形成促進因子、腫瘍増殖因子、肝細胞増殖因子、トランスフォーミング成長因子等）等が挙げられる。

【0018】

サイトカインとしては、例えば、マクロファージ活性化因子、タフトシン、マクロファージ遊走因子、マクロファージ遊走阻止因子、胸腺ホルモン（例えば、チモシン、キラーT細胞活性化因子、サプレッサーT細胞誘導因子、T細胞DNA合成抑制物質等）、シクロスポリン、インターロイキン（例えば、インターロイキン1、インターロイキン2、インターロイキン3、インターロイキン4、インターロイキン5、インターロイキン6等）、コロニー刺激因子、ムラミルジペプチド、インターフェロン（例えば、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ 等）、腫瘍壊死因子、リンホトキシン等が挙げられる。

【0019】

酵素としては、例えば、タンパク分解酵素（例えば、セリンプロテアーゼ（例えば、トリプシン、カリクレイン、ウロキナーゼ、プラスミン等）、チオールプロテアーゼ、カルボキシプロテアーゼ、金属プロテアーゼ等）、血液凝固因子（例えば、血液凝固因子I、血液凝固因子II、血液凝固因子III、血液凝固因子VII、血液凝固因子VIII、血液凝固因子IX、血液凝固因子X、血液凝固因子XI、血液凝固因子XII、血液凝固因子XIII等）、プラスミノーゲン活性化因子、酸化還元酵素（例えば、スーパーオキシドジスムターゼ等）、転移酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、リン酸化酵素（例えば、チロシンキナーゼ、セリンスレオニンキナーゼ等）、脱リン酸化酵素（例えば、肝臓由来アルカリフォスファターゼ、骨由来アルカリフォスファターゼ、胎盤由来アルカリフォスファターゼ等）、脱炭酸酵素等が挙げられる。

【0020】

その他の分泌タンパク質としては、例えば、prostate-specific antigen、apolipoprotein A-I等が挙げられる。

【0021】

分泌されるタンパク質には、他のペプチド配列により付加された融合蛋白質も含まれる。分泌されるタンパク質に付加するペプチド配列としては、インフルエンザ凝集素(HA)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、サブスタンスP、多重ヒスチジインタグ(6×His、10×His等)、プロテインC断片、マルトース結合蛋白質(MBP)、免疫グロブリン定常領域断片、 α -チューブリン断片、 β -ガラクトシダーゼ、B-タグ、c-myc断片、E-タグ(モノクローナルファージ上のエピトープ)、FLAG(Hopp et al. (1988) Bio/Technol. 6: 1204-10)、Ickタグ、p18 HIV断片、HSV-タグ(ヒト単純ヘルペスウイルス糖蛋白質)、SV40T抗原断片、T7-タグ(T7 gene10蛋白質)、VSV-GP断片(Vesicular stomatitisウイルス糖蛋白質)等の蛋白質の識別を容易にする配列、安定性を付与する配列等を選択することができる。

【0022】

また、分泌型タンパク質は、人工的に分泌されるように改変したものも含まれる。人工的に分泌されるように改変するためには、膜結合部分ペプチドを欠失させる、分泌シグナルとして知られている配列(例えば、シグナルペプチド等)を結合する等の方法によって、行うことができる。

人工的に分泌されるように改変された、特に好ましい分泌型タンパク質として、後述する分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼが挙げられる。

【0023】

2. 分泌型タンパク質発現ベクター

本発明において、分泌型タンパク質発現ベクターとは、分泌型タンパク質を発現できるベクターをいう。

以下、分泌型タンパク質発現ベクターについて詳細に説明する。

分泌型タンパク質発現ベクターとしては、転写制御配列および分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを有するベクターがあげられる。好ましい態様においては、ベクターを導入した宿主細胞内で分泌型タンパク質が発現されるように転写制御配列下に分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを結合する。

【0024】

本発明に用いるベクターは、分泌型タンパク質を発現させることができるベクターであれば、その種類は限定されない。例えば、本ベクターには、プラスミド、コスミド、ウイルス(例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス等)、バクテリオファージ、クローニング用ベクター、発現ベクター等の種々のベクターが含まれる(Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987))。

【0025】

本発明において、転写制御配列とは、転写開始活性を持った塩基配列のことである。転写制御配列には、転写制御因子結合配列を有しないプロモーター、転写制御因子結合配列を有するプロモーターなどがあげられる。

【0026】

プロモーターには、アデノウイルスlateプロモーター(Kaufman et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 946)、CAGプロモーター(Niwa et al. (1991) Gene 108: 193-200)、CMV immediate earlyプロモーター(Seed and Aruffo (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3365-9)、EF1 α プロモーター(Mizushima et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 5322; Kim et al. (1990) Gene 91: 217-23)、HSV TKプロモーター、SR α プロモーター(Takebe et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 466)、SV40プロモーター(Mulligan et al. (1979) Nature 277: 108)、SV40 earlyプロモーター(Genetic Engineering Vol.3, Williamson et al., Academic Press (1982) pp.83-141)、SV40 lateプロモーター(Gheysen and Fiers (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1: 385-94)、RSV(ラウス肉腫ウイルス)-LTRプロモーター(Cullen (1987) Methods Enzymol. 152: 684-704)、MMLV-LTRプロモーター等を使用することができる。配列が公知であれば、同一の配列からなるポリヌクレオチドを得ることは当業者にとって容易である。

【0027】

ここで、「ポリヌクレオチド」とは、複数のデオキシリボ核酸 (DNA) またはリボ核酸 (RNA) 等の塩基または塩基対からなる重合体を指し、DNA、cDNA、ゲノムDNA、化学合成DNA及びRNAを含む。また、天然以外の塩基を必要に応じて含むポリヌクレオチドも包含する。

【0028】

転写制御因子結合配列とは、転写制御因子が結合する配列をいい、例えば、エンハンサー、サプレッサー、上流調節配列 (Upstream Regulatory Sequence) などが挙げられる。

転写制御因子結合配列には、例えば、低酸素応答配列 (以下、HREと称する場合がある、Kimura, et. al. (2001) The Journal of Biological Chemistry, 276: 2292-2298)、IL4 responsible element (以下、IL4REと称する場合がある、Richard Moriggl, et. al. (1997) Molecular and cellular Biology, vol17:3663-3678)、E2F結合塩基配列 (Ginsberg, et. al. (1994) Genes & development, 8(22): 2665-2679)、エストロゲン受容体結合配列 (Fawell, et. al. (1990) Cell, 60(6): 953-962)、GATA-1結合塩基配列 (Orkin (1990) Cell, 63(4): 665-72)、AP1結合塩基配列 (Wasylyk, et. al. (1989) Molecular and cellular biology, 9(5): 2247-2250) 又はp53結合塩基配列 (Levine, et. al. (1991) Nature, 351(6326): 453-6) その他の転写因子結合配列 (Steffen, et. al. (1992) Nucleic Acids Research, 20(1): 3-26) などを使用することができる。

HREとしては、例えば、配列番号：1で表される配列、配列番号：2で表される配列、配列番号：3で表される配列、配列番号：4で表される配列などがあげられ、好ましくは、配列番号：1で表される配列である。

IL4REとしては、例えば、配列番号：5で表される配列、配列番号：6で表される配列、配列番号：7で表される配列、配列番号：8で表される配列などがあげられ (Martin Seidel, et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol92:3041-3045)、好ましくは、配列番号：8で表される配列である。

【0029】

これらの転写制御因子結合配列を有するポリヌクレオチドは、配列を基に容易に得ることができる。より具体的な例としては、転写制御因子結合配列と同一および当該配列に相補的な配列を有する一本鎖ポリヌクレオチドをそれぞれ化学合成し、両ポリヌクレオチドを混合する。次に、例えば、95℃で2分から10分加熱した後に、37℃1時間、室温1時間で冷却することによって、二本鎖ポリヌクレオチドを得ることができる。

【0030】

また、分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、分泌型タンパク質をコードする核酸配列を基にプライマーを設計し、遺伝子増幅技術 (PCR) (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 6.1-6.4) により、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物、好ましくはヒトのcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから得ることができる。

【0031】

cDNAライブラリーの作成方法については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))を参照することができる。また、市販のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーを用いてもよい。

【0032】

より具体的に、cDNAライブラリーの作製においては、まず、分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを発現する細胞、臓器、組織等 (例えば、胎盤) からグアニジン超遠心法 (Chirwin et al. (1979) Biochemistry 18: 5294-9)、AGPC法 (Chomczynski and Sacchi (1987) Anal. Biochem. 162: 156-9) 等の公知の手法により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia) 等を用いてmRNAを精製する。Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia) のような、直接mRNAを調製するためのキットを利用してもよい。次に得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業) のようなcDNA合成のためのキットも市

取されている。その他の方法として、cDNAはPCRを利用した5'-RACE法 (Frohman et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9002; Belyavsky et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 2919-32) により合成、及び増幅させてもよい。また、全長率の高いcDNAライブラリーを作製するために、オリゴキャップ法 (Maruyama and Sugano (1994) Gene 138: 171-4; Suzuki (1997) Gene 200: 149-56) 等の公知の手法を採用することもできる。上述のようにして得られたcDNAは、適当なベクター中に組み込むことができる。

【0033】

分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列の確認は、慣用の方法により配列決定することにより行うことができる。例えば、ジデオキシヌクレオチドチェンターミネーション法 (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463) 等により行うことができる。また、適当なDNAシーケンサーを利用して配列を解析することも可能である。

【0034】

ベクターへのポリヌクレオチドの挿入は、リガーゼ反応により行うことができる。このとき、制限酵素サイトを利用することもできる (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11; Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989) Section 5.61-5.63)。

【0035】

また、分泌型タンパク質発現ベクターは、ベクターを導入した宿主細胞内で選択可能なマーカーを含んでいてもよい。選択可能なマーカーとしては、例えば、薬剤耐性遺伝子 (ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子等) や蛍光蛋白質 (GFP、EGFP等) などが挙げられる。

【0036】

さらに、分泌型タンパク質発現ベクターは、好ましくはベクターを大腸菌内で増幅するためのori、及び形質転換された宿主を選抜するためのマーカー遺伝子を持つことができる。アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、及びクロラムフェニコール等の薬剤により宿主の判別を行うことを可能にする薬剤耐性遺伝子の使用が好ましい。

【0037】

3. 分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞

分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞の作製は、定法により上述の分泌型タンパク質発現ベクターを細胞にトランスフェクションすることにより行うことができる。

以下に、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞の作製方法について詳細に説明する。

【0038】

本発明の宿主は、動物に移植可能なものであれば何でもよく、その種類は限定されない。好ましくは、哺乳動物由来の真核細胞 (例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞 (例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞、不死化細胞もしくは腫瘍細胞など) であり、特に好ましくは不死化細胞又は腫瘍細胞である。

【0039】

宿主細胞への分泌型タンパク質発現ベクターの導入は、エレクトポレーション法 (Chu et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15: 1311-26)、カチオニックリポソーム法、電気パルス穿孔法 (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 9.1-9.9)、微小ガラス管を使用した直接注入法、マイクロインジェクション法、リポフェクション (Derijard (1994) Cell 7: 1025-37; Lamb (1993) Nature Genetics 5: 22-30; Rabindran et al. (1993) Science 259: 230-4)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL)、リン酸カルシウム法 (Chen and Okayama (1987) Mol. Cell. Biol. 7: 2745-52)、DEAEデキストラン法 (Lopata et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12: 5707-17; Sussman and Milm

an (1985) Mol. Cell. Biol. 4: 1642-3)、FuGene6試薬(Boehringer-Mannheim)等により行うことができる。

【0040】

宿主細胞の培養は、選択した細胞に適した公知の方法により行うことができる。例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM、F12等の培地を用い、必要に応じウシ胎児血清(FCS)等の血清、アミノ酸、グルコース、ペニシリン又はストレプトマイシンなどを添加することができ、pH約6~8、30~40℃において15~200時間前後の培養を行うことができる。その他、必要に応じ途中で培地の交換を行ったり、通気及び攪拌を行ったりすることができる。

【0041】

分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞は、そのまま用いることも可能であるが、培養中に性質が偏ることを避け、又は、分泌型タンパク質がより多く発現している細胞を取得し、安定した評価を可能とするためにクローニングを行うことができる。細胞のクローニングは、定法(例えば、限外希釈法、フローサイトメトリーによるセルソーティング等)により行うことができる。クローニング後の細胞株から、分泌型タンパク質量の測定、分子生物学的手法(例えば、定量的RT-PCR法、ノーザンブロッティングなど)によるmRNAコピー数の解析により最適な本発明の分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞株を選別することができる。

【0042】

4. 分泌タンパク質量の測定方法

分泌タンパク質量は、既存の方法により測定できる。測定方法は、特に限定されず、例えば、免疫学的手法(例えば、ELISA、RIA、EIA、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット等)、クロマトグラフィー、マスマススペクトロメトリー等により測定することができる。例えば、ELISA法により測定する場合、分泌タンパク質に対する抗体をプレート等の担体に固相化し、次いで、分泌タンパク質を含む試料を添加し、インキュベーションを行う。ここで、分泌タンパク質を含む試料としては、後述の生体液、好ましくは血液、血漿又は血清である。続いて、本発明の抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートのインキュベーションを行う。その後、プレートを洗浄し、二次抗体に付加された標識を検出する。測定に用いられる抗体は、市販のものを用いてもよく、既知の方法によって作製してもよい。また、あらかじめ分泌型タンパク質に、インフルエンザ凝集素(HA)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、サブスタンスP、多重ヒスチジンタグ(6×His、10×His等)、プロテインC断片、マルトース結合蛋白質(MBP)、免疫グロブリン定常領域断片、α-チューブリン断片、β-ガラクトシダーゼ、B-タグ、c-myc断片、E-タグ(モノクローナルファージ上のエピトープ)、FLAG(Hopp et al. (1988) Bio/Technol. 6: 1204-10)、Ickタグ、p18 HIV断片、HSV-タグ(ヒト単純ヘルペスウイルス糖蛋白質)、SV40T抗原断片、T7-タグ(T7 gene10蛋白質)、VSV-GP断片(Vesicular stomatitisウイルス糖蛋白質)等の蛋白質の識別を容易にする配列を付加している場合には、これらを認識する抗体を用いることができる。

【0043】

また、分泌型タンパク質が酵素である場合には、当該酵素活性を測定することにより、分泌タンパク質量を算出することができる。酵素活性を測定することで分泌タンパク質量を定量することができることは、当業者であれば容易に理解できる。本発明において、分泌タンパク質量を測定することには、酵素活性を測定することも含むものとする。

【0044】

5. 非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法

分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、適当な期間飼育し、生体液中の当該分泌タンパク質量を測定することで移植細胞中の転写活性を測定することができる。

【0045】

以下、より詳細に記載する。

分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞は、前述のように得ることができ、又、培養することができる。また、移植する細胞は、in vivoで培養されたものであってもよい (Asano et al, Jpn J Cancer Res. 1999 Jan;90(1):93-100)。

【0046】

培養した細胞を、非ヒト動物に移植する。移植される非ヒト動物は、特に限定されず、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、イヌ、サル、ニワトリ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ネコがあげられ、好ましくはマウス又はラット、特に好ましくはマウスである。また、非ヒト動物への移植部位は、特に限定されず、例えば、皮下、腹腔内、血中、臓器（例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睪丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など）があげられる。

【0047】

移植する細胞数は、特に限定されず、例えば、 10^2 から 10^9 cells/head、好ましくは 10^4 から 10^8 cells/head、より好ましくは 10^5 から 10^7 cells/head、特に好ましくは 5×10^5 から 5×10^6 cells/head である。

【0048】

移植に際しては、細胞以外に薬学的に許容される担体を含んでいてもよい。例えば、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液、血清、生体液およびカルボキシメチルセルロース液などが挙げられる。また、細胞の足場となる固体（例えば、cytodex3 (Amersham Bioscience, 17-0485-01)等）、細胞外基質成分（例えば、コラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、ヘパラン硫酸、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン、エラスチンまたはこれら2種以上の組み合わせ等）またはゲル状の支持体などと組み合わせてもよい。

また、移植に際しては、血管新生因子（例えば、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、酸性線維芽細胞増殖因子 (aFGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β)、アンジオポエチン (angiopoietin)、肝細胞増殖因子 (HGF)等)を含んでいてもよい。

【0049】

移植後、適当な期間（例えば、1時間から1095日など）飼育し、生体液を採取する。生体液は、当該非ヒト動物由来のものであれば、その種類は限定されないが、好ましくは血液、血漿又は血清である。

採取した生体液は、必要に応じて当該分泌型タンパク質を含む画分と含まない画分を分離することができる。血液の場合には、遠心によって、血漿を分離することが望ましい。分離した生体液は、分泌タンパク質量を測定するまで、適当な温度、好ましくは4℃以下、特に好ましくは-20℃以下で保存することができる。

生体液中の分泌タンパク質量は、上述の分泌タンパク質量の測定方法により測定することができる。

【0050】

ここで、当該分泌タンパク質は、分泌型タンパク質発現ベクターから転写され、当該分泌タンパク質に翻訳されて生体液に分泌されたタンパク質である。よって、上記方法によって得られた分泌タンパク質量は、分泌型タンパク質発現ベクターにおける転写活性に依存して変化するものであり、当該分泌タンパク質量を測定することで、分泌型タンパク質発現ベクターに挿入した転写制御配列における転写活性を測定することができる。

【0051】

6. 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法

分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することにより非ヒト動物モデルを作製し、当該非ヒト動物モデルに化合物を投与し、生体液中の分泌タンパク質量を測定することによって、非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングすることができる。

【0052】

以下、より詳細に記載する。

分泌型タンパク質発現ベクターには、転写制御因子結合配列を有するポリヌクレオチドを含んでいることが好ましい。転写制御因子結合配列は、特に限定されず、例えば、HRE、IL4RE、E2F結合塩基配列、エストロゲン受容体結合配列、GATA-1結合塩基配列、AP1結合塩基配列又はp53結合塩基配列その他の転写因子結合配列を使用することができ、好ましくは、HRE又はIL4REである。

【0053】

前述の方法で、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物モデルに移植し、非ヒト動物モデルを作製することができる。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与方法は、特に限定されず、例えば、経口投与、静脈投与、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与、頭蓋内投与等があげられる。また、対照群として無投与、ピークル投与等を設定することができる。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与量は、特に限定されず、例えば、 1 ng/kg から 1 g/kg 、好ましくは 100 ng/kg から 1 g/kg 、より好ましくは 1 mg/kg から 1 g/kg 、特に好ましくは 10 mg/kg から 300 mg/kg である。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与時期は、特に限定されず、例えば、細胞移植前、細胞移植時、細胞移植後などである。

【0054】

生体液中の分泌タンパク質量の測定は、前述の方法で行うことができる。

化合物を投与した非ヒト動物モデルの生体液中の分泌タンパク質量を、対照群の生体液中の分泌タンパク質量と比較することにより、転写活性に影響を与える化合物のスクリーニングを行うことができる。

【0055】

本発明において、化合物には、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、ポリヌクレオチド、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが含まれる。ポリヌクレオチドには、例えば、アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイムヌクレオチド、double strand RNAなどが含まれる。ここで、double strand RNAとは、RNA干渉 (Fire, et. al. (1998) Nature, 391:806-811) を引き起こす二本鎖RNAをいう。

【0056】

7. 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数または腫瘍体積を測定する方法

分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、一定期間飼育し、生体液中の分泌タンパク質量を測定することによって、移植した細胞数または腫瘍体積の増減を測定することができる。

【0057】

以下、より詳細に記載する。

分泌型タンパク質発現ベクターには、恒常的転写制御配列からなるポリヌクレオチドを含んでいることが好ましい。ここで、恒常的転写制御配列とは、恒常的に転写開始活性を有している配列をいう。恒常的転写制御配列は、恒常的に転写開始活性を有している配列であれば特に限定されず、例えば、SV40プロモーター、CMVプロモーター、チミジンキナーゼプロモーター、Ubiquitin Cプロモーター、Elongation factor 1 alpha (EF1a) プロモーター、 β -actinプロモーター、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase プロモーター、Phosphoglycerokinaseプロモーター、 β 2-Microglobulinプロモーター、 β -Glucuronidaseプロモーター等を使用することができる。SV40プロモーターとしては、例えば、

配列番号：9で表される配列があげられる。

前述の方法で、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、生体液中の分泌タンパク質量の測定を行うことができる。

【0058】

ここで、恒常的転写制御配列による転写活性は、常に一定の活性を示すと考えられるため、当該分泌タンパク質は、細胞数に依存した量が生体液中に分泌される。よって、上記方法によって得られた分泌タンパク質量は、非ヒト動物モデルにおける移植細胞数に依存して変化するものであり、当該分泌タンパク質量を測定することで、移植細胞数を測定することができる。

【0059】

したがって、飼育する前および適当な期間飼育した後での生体液中の分泌タンパク質量を比較することにより、非ヒト動物モデルにおいて、移植した細胞数の増減を測定することができる。また、固形腫瘍においては、細胞数は腫瘍体積と相関すると考えられるため、腫瘍体積の増減をも測定することができる。

【0060】

8. 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法

分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することにより非ヒト動物モデルを作製し、得られた非ヒト動物モデルに化合物を投与し、生体液中の分泌タンパク質量を測定することによって、移植した細胞数または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングすることができる。

【0061】

以下、より詳細に記載する。

分泌型タンパク質発現ベクターには、恒常的転写制御配列からなるポリヌクレオチドを含んでいることが好ましい。ここで、恒常的転写制御配列とは、恒常的に転写開始活性を有している配列をいう。恒常的転写制御配列は、恒常的に転写開始活性を有している配列であれば特に限定されず、例えば、SV40プロモーター、CMVプロモーター、チミジンキナーゼプロモーター、Ubiquitin Cプロモーター、Elongation factor 1 alpha (EF1a) プロモーター、 β -actinプロモーター、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase プロモーター、Phosphoglycerokinaseプロモーター、 β 2-Microglobulinプロモーター、 β -Glucuronidaseプロモーター等を使用することができる。SV40プロモーターとしては、例えば、配列番号：9で表される配列があげられる。

【0062】

前述の方法で、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を移植し、非ヒト動物モデルを作製することができる。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与方法は、特に限定されず、例えば、経口投与、静脈投与、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与、頭蓋内投与等があげられる。また、対照群として無投与、ピークル投与等を設定することができる。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与量は、特に限定されず、例えば、 1 ng/kg から 1 g/kg 、好ましくは 100 ng/kg から 1 g/kg 、より好ましくは 1 mg/kg から 1 g/kg 、特に好ましくは 10 mg/kg から 300 mg/kg である。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与時期は、特に限定されず、例えば、細胞移植前、細胞移植時、細胞移植後などである。

生体液中の分泌タンパク質量の測定は、前述の方法で行うことができる。

【0063】

化合物を投与した非ヒト動物モデルの生体液中の分泌タンパク質量を、対照群の生体液中の分泌タンパク質量と比較することにより、移植した細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングすることができる。また、固形腫瘍においては、細胞数は腫瘍体積と相関すると考えられるため、腫瘍体積に影響を与える化合物をもスクリーニングすることができる。

【0064】

9. 測定キット

分泌型タンパク質発現ベクターを含有する測定キットは、(1) 非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法（前記「5. 非ヒト動物における移植細胞中の転写活性の測定方法」を示す）、(2) 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法（前記「6. 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す）、(3) 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数または腫瘍体積を測定する方法（前記「7. 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数または腫瘍体積を測定する方法」を示す）、又は(4) 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングする方法（前記「8. 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す）に用いるものであり、分泌型タンパク質発現ベクターを含んでいればよく、その他の組成は限定されない。

当該測定キットに含有されるものとしては、例えば、コントロールベクター、トランスフェクション試薬、細胞培養液、測定用抗分泌型タンパク質抗体、測定用緩衝液などが挙げられる。

【0065】

分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を含有する測定キットは、(1) 非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法（前記「5. 非ヒト動物における移植細胞中の転写活性の測定方法」を示す）、(2) 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法（前記「6. 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す）、(3) 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数または腫瘍体積を測定する方法（前記「7. 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数または腫瘍体積を測定する方法」を示す）、又は(4) 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングする方法（前記「8. 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す）に用いるものであり、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を含んでいればよく、その他の組成は限定されない。

当該測定キットに含有されるものとしては、例えば、コントロール細胞、細胞培養液、測定用抗分泌型タンパク質抗体、測定用緩衝液などが挙げられる。

【0066】

分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を移植した非ヒト動物を含有する測定キットは、(1) 非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法（前記「5. 非ヒト動物における移植細胞中の転写活性の測定方法」を示す）、(2) 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法（前記「6. 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す）、(3) 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数または腫瘍体積を測定する方法（前記「7. 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数または腫瘍体積を測定する方法」を示す）、又は(4) 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングする方法（前記「8. 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す）に用いるものであり、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を移植した非ヒト動物を含んでいればよく、その他の組成は限定されない。

当該測定キットに含有されるものとしては、例えば、コントロール非ヒト動物、測定用抗分泌型タンパク質抗体、測定用緩衝液などが挙げられる。

【0067】

10. 本発明のPLAP

本発明において、分泌型タンパク質は、分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼを用いることが好ましい。

以下、分泌型タンパク質として、分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼを用いた場合について詳細に説明する。

【0068】

本発明において、胎盤由来アルカリフォスファターゼ（以下、PLAPと称することがある）とは、胎盤に由来し、アルカリフォスファターゼの酵素活性を有するポリペプチドをいい、例えば、GenBankアクセッション番号M13077で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むものである。アルカリフォスファターゼの酵素活性の測定方法は、特に限定されず、例えば、後述のPLAP活性の測定方法によって測定することができる。

また、分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼ（以下、本発明のPLAPと称することがある）とは、アルカリフォスファターゼの酵素活性を有し、かつ、細胞外に分泌されるように改変されたポリペプチドをいい、配列番号：11で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むものである。

【0069】

以下、本発明のPLAPについて詳細に説明する。

配列番号：11で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：13で表されるアミノ酸配列または配列番号：15で表されるアミノ酸配列が挙げられる。

【0070】

また、配列番号：11で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：11で表されるアミノ酸配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

特に、配列番号：11で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、上記のアミノ酸配列の他、配列番号：11で表わされるアミノ酸配列において1個又は複数個（例えば1個又は数個）のアミノ酸に欠失、置換又は付加等の変異が生じたアミノ酸配列であって、アルカリフォスファターゼの酵素活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列があげられる。

例えば、(i) 配列番号：11で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：11で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：11で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：11で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、(v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

【0071】

1又は複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなる変異ポリペプチドであって、元のポリペプチドと同じ生物学的活性が維持されるポリペプチドも、本発明の範囲に含まれる (Mark et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-6; Zoller and Smith (1982) Nucleic Acids Res. 10: 6487-500; Wang et al. (1984) Science 224: 1431-3; Dalbadie-McFarland et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6409-13)。

【0072】

ここで、アミノ酸の置換とは、配列中のアミノ酸残基の一つ以上が、異なる種類のアミノ酸残基に変えられた変異を意味する。このような置換により本発明のPLAPのアミノ酸配列を改変する場合、蛋白質の機能を保持するためには、保存的な置換を行うことが好ましい。保存的な置換とは、置換前のアミノ酸と似た性質のアミノ酸をコードするように配列を変化させることである。アミノ酸の性質は、例えば、非極性アミノ酸(Ala, Ile, Leu,

Met, Phe, Pro, Trp, Val)、非荷電性アミノ酸(Asn, Cys, Gln, Gly, Ser, Thr, Tyr)、酸性アミノ酸(Asp, Glu)、塩基性アミノ酸(Arg, His, Lys)、中性アミノ酸(Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val)、脂肪族アミノ酸(Ala, Gly)、分枝アミノ酸(Ile, Leu, Val)、ヒドロキシアミノ酸(Ser, Thr)、アミド型アミノ酸(Gln, Asn)、含硫アミノ酸(Cys, Met)、芳香族アミノ酸(His, Phe, Trp, Tyr)、複素環式アミノ酸(His, Trp)、イミノ酸(Pro, 4Hyp)等に分類することができる。

従って、非極性アミノ酸同士、あるいは非荷電性アミノ酸同士で置換させることが好ましい。中でも、Ala、Val、Leu及びIleの間、Ser及びThrの間、Asp及びGluの間、Asn及びGlnの間、Lys及びArgの間、Phe及びTyrの間の置換は、蛋白質の性質を保持する置換として好ましい。変異されるアミノ酸の数及び部位は特に制限ない。

【0073】

本発明のPLAPには、他のペプチド配列により付加された融合蛋白質も含まれる。本発明のPLAPに付加するペプチド配列としては、インフルエンザ凝集素(HA)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、サブスタンスP、多重ヒスチジンタグ(6×His、10×His等)、プロテインC断片、マルトース結合蛋白質(MBP)、免疫グロブリン定常領域断片、α-チューブリン断片、β-ガラクトシダーゼ、B-タグ、c-myc断片、E-タグ(モノクローナルファージ上のエピトープ)、FLAG(Hopp et al. (1988) Bio/Technol. 6: 1204-10)、Ickタグ、p18 HIV断片、HSV-タグ(ヒト単純ヘルペスウイルス糖蛋白質)、SV40T抗原断片、T7-タグ(T7 gene10蛋白質)、VSV-GP断片(Vesicular stomatitisウイルス糖蛋白質)等の蛋白質の識別を容易にする配列、組換え技術により蛋白質を発現させる際に安定性を付与する配列等を選択することができる。

【0074】

本発明のPLAPとしては、以上のようなポリペプチドがあげられ、例えば、前記の配列番号：11で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：11で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同質のPLAP活性を有し、かつ、細胞外に分泌されるようなポリペプチドなどが好ましい。ここで、「PLAP活性」とは、PLAPにおけるアルカリフォスファターゼの酵素活性を意味する。実質的に同質の活性とは、その活性が性質的に(例、生理化学的に、または薬理学的に)同質であることを示す。例えば、単位タンパク質量あたりのPLAP活性が、配列番号：11で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが有するPLAP活性と比較して、例えば、1%以上、好ましくは3%以上、より好ましくは10%以上、より好ましくは30%以上PLAP活性を有する場合に実質的に同質の活性を有するということができる。PLAP活性の具体的な測定方法については後述する。

【0075】

11. 本発明のPLAPベクター

本発明において、分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼ発現ベクター(以下、本発明のPLAPベクターと称する場合がある)とは、本発明のPLAPを発現させることができるベクターをいう。

【0076】

以下、本発明のPLAPベクターについて詳細に説明する。

本発明のPLAPベクターには、転写制御配列および本発明のPLAPをコードするポリヌクレオチドを含むベクターがあげられる。好ましい態様においては、ベクターを導入した宿主細胞内で本発明のPLAPが発現されるように転写制御配列下に本発明のPLAPをコードするポリヌクレオチドを結合する。

【0077】

本発明のPLAPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号：10で表される核酸配列と同一もしくは実質的に同一の核酸配列を有するポリヌクレオチドを含むものである。実質的に同一の核酸配列を有するポリヌクレオチドは、前記本発明のPLAPをコードする核酸配列を有するポリヌクレオチドであれば何でもよい。例えば、配列番号：11で表わされるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド(配列番号：10で表される核酸配列に加え

て、遺伝子暗号の縮重により配列番号：10で表される核酸配列とは異なる核酸配列を含む)のほか、配列番号：11で表わされるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなる変異ポリペプチドであって、PLAP活性を有し、かつ、細胞外に分泌されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明において使用することができる。

【0078】

配列番号：10で表される核酸配列と実質的に同一の核酸配列を有するポリヌクレオチドとして、配列番号：12および配列番号：14が挙げられる。これらのポリヌクレオチドは、pSEAP、pSEAP2(クロンテック社製)の部分配列からなるポリヌクレオチドであり、クロンテック社から購入することができる。

【0079】

また、本発明のPLAPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号：10に記載の核酸配列を基にプライマーを設計し、遺伝子増幅技術(PCR)(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 6.1-6.4)により、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物、好ましくはヒトのcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから得ることができる。

【0080】

以下に、本発明のPLAPをコードするポリヌクレオチドを取得する方法の一例を記載する。

ベクタープラスミドM13tg131(Kiney, et. al. (1983) 26(1): 91-99)をPvu IIで切断し、MCS配列断片を得ることができる。当該MCS配列断片をベクタープラスミドpUC18(東洋紡績株式会社)のPvu IIサイト中へ、リガーゼ反応(TAKARA, Cat. 6022)により挿入しベクタープラスミドpUG131を得ることができる。

ヒト胎盤cDNAライブラリーを鋳型として、配列番号：16および配列番号：17で示したオリゴDNAをプライマーとしてPCR反応を行って273 bpのPLAP cDNA断片1を得ることができる。次に、ヒト胎盤cDNAライブラリーを鋳型として、配列番号：18および配列番号：19で示したオリゴDNAをプライマーとしてPCR反応を行って1028 bpのPLAP cDNA断片2を得ることができる。プライマーの塩基配列は以下のとおりである。

プライマー：CCAGAATTCCTGCCTCGCCACTGTCC(配列番号：16)

プライマー：TTAGGATCCTGGCAGCTGTCAC(配列番号：17)

プライマー：GTGACAGCTGCCAGGATCCTAA(配列番号：18)

プライマー：AGGACCGTGTAGGCCTCCCTGT(配列番号：19)

当該PLAP cDNA断片1および2をBam HIで切断後、リガーゼ反応(TAKARA, Cat. 6022)により連結し、PLAP cDNA断片3を得ることができる。次に、当該PLAP cDNA断片3をEco RIおよびSma Iで切断し、Eco RIおよびSma Iで切断されたpBlueScript KS(Stratagene)中へ、リガーゼ反応(TAKARA, Cat. 6022)により挿入することができる。得られたプラスミドをHind IIIおよびXma Iで切断して、PLAP cDNA断片4を得ることができる。

【0081】

PLAP cDNAの3'側断片を合成するために、配列番号：20および配列番号：21で示したオリゴDNAを適当な条件でアニーリングさせた後、DNA polymeraseを用いて二本鎖DNA断片とし、pUG131のHinc IIサイトにリガーゼ反応(TAKARA, Cat. 6022)により挿入することができる。次に、当該プラスミドをXma IおよびAat IIで切断して、PLAP cDNA断片5を得ることができる。オリゴDNAの塩基配列は以下のとおりである。

オリゴDNA：

AAGCCCGGGATCGTAAGGCCTACACAGTGCTACTGTATGGCAATGGCCCAGGGTATGTCCTAAAGGATGGAGCTAGACCA
GATGTCACAGAGTCAGAG(配列番号：20)

オリゴDNA：

AAAGACAGCGACGTCTTCCCTGCGTGAGTCTCTTCATCTAACGGTACGGCCGATTGCTGACGGTACTCTGGAGATCCAG
ACTCTGACTCTGTGACAT(配列番号：21)

【0082】

同様に、配列番号：22および配列番号：23で示したオリゴDNAを適当な条件でアニーリングさせた後、DNA polymeraseを用いて二本鎖DNA断片とし、pUG131のHinc IIサイトにリガーゼ反応（TAKARA, Cat. 6022）により挿入することができる。次に、当該プラスミドをAat IIおよびBgl IIで切断して、PLAP cDNA断片6を得ることができる。オリゴDNAの塩基配列は以下のとおりである。

オリゴDNA：

GGAAGACGTGCGTGTCTTTGCAAGAGGTCCCCAGGCACATCTCGTGCATGGCGTACAGGAACAGACTTTCATCGCTCATGTAATGGCATTTCGCAGCAT（配列番号：22）

オリゴDNA：

TCCAGATCTGGGTAAACCTGGATGGGCAGCGTCTGTCTGCTACCTGCTGGTGGAGCTAAATCGCAAGCGGTATATGGCTCCAAACATGCTGCCAATGCCATT（配列番号：23）

当該PLAP cDNA断片5および6を、あらかじめXma IおよびBgl IIで切断したpUG131中へ、リガーゼ反応（TAKARA, Cat. 6022）により挿入することができる。当該プラスミドをXma IおよびBgl IIで切断することにより、PLAP cDNA断片7を得ることができる。

【0083】

続いて、配列番号：24および配列番号：25で示したオリゴDNAを合成し、アニーリングさせてアダプターDNA1を得ることができる。オリゴDNAの塩基配列は以下のとおりである。

オリゴDNA：AATTCAAGCTTACCATG（配列番号：24）

オリゴDNA：GTAAGCTTG（配列番号：25）

一方、PLAP cDNA断片4とPLAP cDNA断片7を、pUG131のHind III / Bgl IIサイトにリガーゼ反応（TAKARA, Cat. 6022）により挿入することができる。当該プラスミドをEco RIおよびSph Iで切断し、当該アダプターDNA1をリガーゼ反応（TAKARA, Cat. 6022）により挿入することができる。以上の操作により、本発明のPLAPをコードするポリヌクレオチド（配列番号：10）を得ることができる。

【0084】

本発明のPLAPをコードするポリヌクレオチドに含まれる、配列番号：11で表されるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』（Cold Spring Harbor Press (1989))、『Current Protocols in Molecular Biology』（John Wiley & Sons (1987-1997)；特にSection 8.1-8.5）、Hashimoto-Goto et al. (1995) Gene 152: 271-5、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92、Kramer and Fritz (1987) Method. Enzymol. 154: 350-67、Kunkel (1988) Method. Enzymol. 85: 2763-6等に記載の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製することができる。

また、ポリヌクレオチドに変異を導入するには、Kunkel法や Gapped duplex法等の公知手法により、部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット、例えばQuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit（ストラタジーン社製）、GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System（インビトロジェン社製）、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System（Mutan-K、Mutan-Super Express Km等：タカラバイオ社製）等を用いて行うことができる。

【0085】

本発明のPLAPをコードするポリヌクレオチドの塩基配列の確認は、慣用の方法により配列決定することにより行うことができる。例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法（Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463）等により行うことができる。また、適当なDNAシーケンサーを利用して配列を解析することも可能である。

【0086】

また、本発明のPLAPベクターは、pSEAP、pSEAP2（クロンテック社製）に転写制御配列を挿入することによっても得ることができる。

【0087】

12. 本発明のPLAPベクター導入細胞

本発明のPLAPベクター導入細胞の作製は、定法により上述の本発明のPLAPベクターを細胞にトランスフェクションすることにより行うことができる。

以下に、本発明のPLAPベクター導入細胞の作製方法について詳細に説明する。

【0088】

本発明の宿主は、動物に移植可能なものであれば何でもよく、その種類は限定されない。好ましくは、哺乳動物由来の真核細胞（例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、臍臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞、不死化細胞もしくは腫瘍細胞など）であり、特に好ましくは不死化細胞又は腫瘍細胞である。

【0089】

宿主細胞への本発明のPLAPベクターの導入は、エレクトポレーション法(Chu et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15: 1311-26)、カチオニックリポソーム法、電気パルス穿孔法(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 9.1-9.9)、微小ガラス管を使用した直接注入法、マイクロインジェクション法、リポフェクション(Derijard (1994) Cell 7: 1025-37; Lamb (1993) Nature Genetics 5: 22-30; Rabindran et al. (1993) Science 259: 230-4)、リポフェクタミン法(GIBCO-BRL)、リン酸カルシウム法(Chen and Okayama (1987) Mol. Cell. Biol. 7: 2745-52)、DEAEデキストラン法(Lopata et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12: 5707-17; Sussman and Milman (1985) Mol. Cell. Biol. 4: 1642-3)、FuGene6試薬(Boehringer-Mannheim)等により行うことができる。

【0090】

宿主細胞の培養は、選択した細胞に適した公知の方法により行うことができる。例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM、F12等の培地を用い、必要に応じウシ胎児血清(FCS)等の血清、アミノ酸、グルコース、ペニシリン又はストレプトマイシンなどを添加することができ、pH約6~8、30~40℃において15~200時間前後の培養を行うことができる。その他、必要に応じ途中で培地の交換を行ったり、通気及び攪拌を行ったりすることができる。

【0091】

本発明のPLAPベクター導入細胞は、そのまま用いることも可能であるが、培養中に性質が偏ることを避け、又は、本発明のPLAPがより多く発現している細胞を取得し、安定した評価を可能とするためにクローニングを行うことができる。細胞のクローニングは、定法（例えば、限外希釈法、フローサイトメトリーによるセルソーティング等）により行うことができる。クローニング後の細胞株から、PLAP活性の測定、分子生物学的手法（例えば、定量的RT-PCR法、ノーザンブロッティングなど）によるmRNAコピー数の解析により最適な本発明のPLAPベクター導入細胞株を選別することができる。

【0092】

13. PLAP活性の測定方法

(1) In vitroにおける本発明のPLAP活性の測定方法

本発明のPLAPベクター導入細胞を適当な時間培養し、培養上清を基質溶液と混合し、適当な時間インキュベートした後、PLAP活性を測定する。PLAP活性は、化学発光強度を測定すること又は比色法を用いること、好ましくは化学発光強度を測定することによって、測定することができる。

【0093】

以下、より詳細に記載する。

本発明のPLAPベクター導入細胞は、上述のように得ることができ、又、培養することが

できる。培養液にFCSを加える場合には、当該FCS中のPLAP活性を失活させるため、熱処理をすることが望ましい。熱処理は、50℃から80℃、好ましくは60℃から70℃、特に好ましくは64℃から66℃で、5分から120分、好ましくは20分から60分加熱することにより行うことができる。

【0094】

PLAP活性を測定する際には、あらかじめ培養した本発明のPLAPベクター導入細胞を、細胞培養プレートに蒔き、さらに培養することが望ましい。

適当な時間（例えば、2－96時間）培養した後、培養上清を回収する。回収した培養上清中に含まれる血清由来のPLAP活性を失活させるため、50℃から80℃、好ましくは60℃から70℃、特に好ましくは64℃から66℃で、5分から120分、好ましくは20分から60分加熱することができる。

【0095】

次に、培養上清を基質溶液と混合する。基質溶液は、PLAPの基質となる物質を含み、PLAPが反応して化学発光を起こすものであれば、その種類は限定されない。基質には、例えば、4-methoxy-4-(3-phosphatephenyl) spiro [1,2-dioxetane-3,2'-adamantane], disodium salt（例えば、Lumi-Phos 530（Lumigen, Inc.）など）を用いることができる。また、基質を溶解する溶液としては、種々の緩衝液を使用することができ、例えば、0.28 M Na_2CO_3 - NaHCO_3 、8 mM MgSO_4 、pH 10.0からなる水溶液などを用いることができる。培養上清は、適当に希釈して用いることができ、基質溶液の10%（v/v）程度になるように加えることが望ましい。

【0096】

培養上清を基質溶液と混合し、適当な時間インキュベートする。インキュベートは、5℃から38℃、好ましくは15℃から30℃、特に好ましくは20℃から25℃で、10分から24時間、好ましくは30分から4時間行うことができる。インキュベート中は、遮光することが望ましい。

【0097】

インキュベーション後、化学発光強度を測定する。化学発光強度は、市販のプレートリーダー（例えば、Perkin Elmer, ARVO）を用いることによって測定できる。測定の結果得られた値をPLAP活性とすることができる。

【0098】

（2）In vivoにおける本発明のPLAP活性の測定方法

本発明のPLAPベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、適当な期間飼育し、生体液を基質溶液と混合し、適当な時間インキュベートした後、化学発光強度を測定することによって、PLAP活性を測定することができる。

【0099】

以下、より詳細に記載する。

上述の方法により、本発明のPLAPベクター導入細胞を非ヒト動物に移植する。

移植後、適当な期間飼育し、生体液を採取する。生体液は、当該非ヒト動物由来のものであれば、その種類は限定されないが、好ましくは血液、血漿又は血清である。

採取した生体液は、必要に応じてPLAPを含む画分と含まない画分を分離することができる。血液の場合には、遠心によって、血漿を分離することが望ましい。分離した生体液は、PLAP活性を測定するまで、適当な温度、好ましくは4℃以下、特に好ましくは-20℃以下で保存することができる。

【0100】

また、生体液中に含まれる非ヒト動物由来のPLAP活性を失活させるため、50℃から80℃、好ましくは60℃から70℃、特に好ましくは64℃から66℃で、5分から120分、好ましくは20分から60分加熱することができる。

【0101】

次に、生体液を基質溶液と混合する。基質溶液は、PLAPの基質となる物質を含み、PLAPが反応して化学発光を起こすものであれば、その種類は限定されない。基質には、例えば

、4-methoxy-4-(3-phosphatophenyl) spiro [1,2-dioxetane-3,2'-adamantane], disodium salt (例えば、Lumi-Phos 530 (Lumigen, Inc.) など) を用いることができる。また、基質を溶解する溶液としては、種々の緩衝液を使用することができ、例えば、0.28 M $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 、8 mM MgSO_4 、pH 10.0からなる水溶液などを用いることができる。生体液は、適当に希釈して用いることができ、基質溶液の1から10% (v/v) 程度加えることが望ましい。

【0102】

生体液を基質溶液と混合し、適当な時間インキュベートする。インキュベートは、5℃から38℃、好ましくは15℃から30℃、特に好ましくは20℃から25℃で、10分から24時間、好ましくは30分から4時間行うことができる。インキュベート中は、遮光することが望ましい。

【0103】

インキュベーション後、化学発光強度を測定する。化学発光強度は、市販のプレートリーダー (例えば、Perkin Elmer, ARVO) を用いることによって測定できる。測定の結果得られた値をPLAP活性とすることができる。

【0104】

14. 非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法

本発明のPLAPベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、適当な期間飼育し、生体液中のPLAP活性を測定することで移植細胞中の転写活性を測定することができる。

【0105】

以下、より詳細に記載する。

本発明のPLAPベクター導入細胞は、前述のように得ることができ、又、培養することができる。また、移植する細胞は、in vivoで培養されたものであってもよい (Asano et al, Jpn J Cancer Res. 1999 Jan;90(1):93-100)。

【0106】

培養した細胞を、非ヒト動物に移植する。移植される非ヒト動物は、特に限定されず、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、イヌ、サル、ニワトリ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ネコがあげられ、好ましくはマウス又はラット、特に好ましくはマウスである。また、非ヒト動物への移植部位は、特に限定されず、例えば、皮下、腹腔内、血中、臓器 (例えば、脳、脳の各部位 (例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管 (例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睪丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など) があげられる。

【0107】

移植する細胞数は、特に限定されず、例えば、 10^2 から 10^9 cells/head、好ましくは 10^4 から 10^8 cells/head、より好ましくは 10^5 から 10^7 cells/head、特に好ましくは 5×10^5 から 5×10^6 cells/head である。

【0108】

移植に際しては、細胞以外に薬学的に許容される担体を含んでいてもよい。例えば、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液、血清、生体液およびカルボキシメチルセルロース液などが挙げられる。また、細胞の足場となる固体 (例えば、cytodex3 (Amersham Bioscience, 17-0485-01) 等)、細胞外基質成分 (例えば、コラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、ヘパラン硫酸、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン、エラスチンまたはこれら2種以上の組み合わせ等) またはゲル状の支持体などと組み合わせてもよい。

また、移植に際しては、血管新生因子 (例えば、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、酸性線維芽細胞増殖因子 (aFGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β)、アンジ

オボエチン（angiotensin）、肝細胞増殖因子（HGF）等）を含んでもよい。

【0109】

移植後、適当な期間（例えば、1時間から1095日など）飼育し、生体液を採取する。生体液は、当該非ヒト動物由来のものであれば、その種類は限定されないが、好ましくは血液、血漿又は血清である。

採取した生体液は、必要に応じて本発明のPLAPを含む画分と含まない画分を分離することができる。血液の場合には、遠心によって、血漿を分離することが望ましい。分離した生体液は、PLAP活性を測定するまで、適当な温度、好ましくは4℃以下、特に好ましくは-20℃以下で保存することができる。

PLAP活性は、上述のPLAP活性の測定方法により測定することができる。

【0110】

ここで、本発明のPLAPは、本発明のPLAPベクターから転写され、本発明のPLAPに翻訳されて生体液に分泌されたPLAPである。よって、上記方法によって得られたPLAP活性は、本発明のPLAPベクターにおける転写活性に依存して変化するものであり、当該PLAP活性を測定することで、本発明のPLAPベクターに挿入した転写制御配列における転写活性を測定することができる。

【0111】

15. 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法

本発明のPLAPベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することにより非ヒト動物モデルを作製し、当該非ヒト動物モデルに化合物を投与し、生体液中のPLAP活性を測定することによって、非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングすることができる。

【0112】

以下、より詳細に記載する。

本発明のPLAPベクターには、転写制御因子結合配列を有するポリヌクレオチドを含んでいることが好ましい。転写制御因子結合配列は、特に限定されず、例えば、HRE、IL4RE、E2F結合塩基配列、エストロゲン受容体結合配列、GATA-1結合塩基配列、AP1結合塩基配列又はp53結合塩基配列その他の転写因子結合配列などを使用することができ、好ましくは、HRE又はIL4REである。

【0113】

前述の方法で、本発明のPLAPベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、非ヒト動物モデルを作製することができる。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与方法は、特に限定されず、例えば、経口投与、静脈投与、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与、頭蓋内投与等があげられる。また、対照群として無投与、ピークル投与を設定することができる。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与量は、特に限定されず、例えば、1 ng/kg から1 g/kg、好ましくは100 ng/kg から1 g/kg、より好ましくは1 mg/kg から1 g/kg、特に好ましくは10 mg/kg から300 mg/kg である。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与時期は、特に限定されず、例えば、細胞移植前、細胞移植時、細胞移植後などである。

生体液中のPLAP活性の測定は、前述の方法で行うことができる。

化合物を投与した非ヒト動物モデルの生体液中のPLAP活性を、対照群の生体液中のPLAP活性と比較することにより、転写活性に影響を与える化合物のスクリーニングを行うことができる。

【0114】

16. 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数または腫瘍体積を測定する方法

本発明のPLAPベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、一定期間飼育し、生体液中のPL

AP活性を測定することによって、移植した細胞数または腫瘍体積の増減を測定することができる。

【0115】

以下、より詳細に記載する。

本発明のPLAPベクターには、恒常的転写制御配列からなるポリヌクレオチドを含んでいることが好ましい。ここで、恒常的転写制御配列とは、恒常的に転写開始活性を有している配列をいう。恒常的転写制御配列は、恒常的に転写開始活性を有している配列であれば特に限定されず、例えば、SV40プロモーター、CMVプロモーター、チミジンキナーゼプロモーター、Ubiquitin Cプロモーター、Elongation factor 1 alpha (EF1a) プロモーター、 β -actinプロモーター、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase プロモーター、Phosphoglycerokinaseプロモーター、 β 2-Microglobulinプロモーター、 β -Glucuronidaseプロモーター等を使用することができる。SV40プロモーターとしては、例えば、配列番号：9で表される配列があげられる。

前述の方法で、本発明のPLAPベクター導入細胞を非ヒト動物モデルに移植し、生体液中のPLAP活性の測定を行うことができる。

【0116】

ここで、恒常的転写制御配列による転写活性は、常に一定の活性を示すと考えられるため、本発明のPLAPは、細胞数に依存した量が生体液中に分泌される。よって、上記方法によって得られたPLAP活性は、非ヒト動物モデルにおける移植細胞数に依存して変化するものであり、当該PLAP活性を測定することで、移植細胞数を測定することができる。

【0117】

したがって、飼育する前および適当な期間飼育した後での生体液中のPLAP活性を比較することにより、非ヒト動物モデルにおいて、移植した細胞数の増減を測定することができる。また、固形腫瘍においては、細胞数は腫瘍体積と相関すると考えられるため、腫瘍体積の増減をも測定することができる。

【0118】

17. 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法

本発明のPLAPベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することにより非ヒト動物モデルを作製し、得られた非ヒト動物モデルに化合物を投与し、生体液中のPLAP活性を測定することによって、移植細胞数または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングすることができる。

【0119】

以下、より詳細に記載する。

本発明のPLAPベクターには、恒常的転写制御配列からなるポリヌクレオチドを含んでいることが好ましい。ここで、恒常的転写制御配列とは、恒常的に転写開始活性を有している配列をいう。恒常的転写制御配列は、恒常的に転写開始活性を有している配列であれば特に限定されず、例えば、SV40プロモーター、CMVプロモーター、チミジンキナーゼプロモーター、Ubiquitin Cプロモーター、Elongation factor 1 alpha (EF1a) プロモーター、 β -actinプロモーター、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase プロモーター、Phosphoglycerokinaseプロモーター、 β 2-Microglobulinプロモーター、 β -Glucuronidaseプロモーター等を使用することができる。SV40プロモーターとしては、例えば、配列番号：9で表される配列があげられる。

前述の方法で、本発明のPLAPベクター導入細胞を移植し、非ヒト動物モデルを作製することができる。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与方法は、特に限定されず、例えば、経口投与、静脈投与、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与、頭蓋内投与等があげられる。対照群として無投与、ピークル投与を設定することができる。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与量は、特に限定されず、例えば、 1 ng/kg から 1 g/kg 、好ましくは 100 ng/kg から 1 g/kg 、より好ましくは 1 mg/kg

から 1 g / k g、特に好ましくは 10 m g / k g から 300 m g / k g である。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与時期は、特に限定されず、例えば、細胞移植前、細胞移植時、細胞移植後などである。

生体液中のPLAP活性の測定は、前述の方法で行うことができる。

化合物を投与した非ヒト動物モデルの生体液中のPLAP活性を、対照群の生体液中のPLAP活性と比較することにより、移植した細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングすることができる。また、固形腫瘍においては、細胞数は腫瘍体積と相関すると考えられるため、腫瘍体積に影響を与える化合物をもスクリーニングすることができる。

【0120】

18. 測定キット

分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼ発現ベクターを含有する測定キットは、(1) 非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法(前記「14. 非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法」を示す)、(2) 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「15. 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)、(3) 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「16. 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)、又は、(4) 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「17. 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)に用いるものであり、本発明のPLAPベクターを含んでいればよく、その他の組成は限定されない。

当該測定キットに含有されるものとしては、例えば、コントロールベクター、トランスフェクション試薬、細胞培養液、PLAP基質溶液、PLAP活性測定用緩衝液などが挙げられる。

【0121】

分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼ発現ベクター導入細胞を含有する測定キットは、(1) 非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法(前記「14. 非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法」を示す)、(2) 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「15. 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)、(3) 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「16. 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)、又は、(4) 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「17. 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)に用いるものであり、本発明のPLAPベクター導入細胞を含んでいればよく、その他の組成は限定されない。

当該測定キットに含有されるものとしては、例えば、コントロール細胞、細胞培養液、PLAP基質溶液、PLAP活性測定用緩衝液などが挙げられる。

【0122】

分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼ発現ベクター導入細胞を移植した非ヒト動物を含有する測定キットは、(1) 非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法(前記「14. 非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法」を示す)、(2) 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「15. 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)、(3) 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指

標として移植細胞数または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法（前記「16. 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す）、又は、（4）非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングする方法（前記「17. 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す）に用いるものであり、本発明のPLAPベクター導入細胞を移植した非ヒト動物を含んでいればよく、その他の組成は限定されない。

当該測定キットに含有されるものとしては、例えば、コントロール非ヒト動物、PLAP基質溶液、PLAP活性測定用緩衝液などが挙げられる。

【0123】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA：デオキシリボ核酸

cDNA：相補的デオキシリボ核酸

A：アデニン

T：チミン

G：グアニン

C：シトシン

U：ウラシル

N：アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）またはチミン（T）

RNA：リボ核酸

mRNA：メッセンジャーリボ核酸

dATP：デオキシアデノシン三リン酸

dTTP：デオキシチミジン三リン酸

dGTP：デオキシグアノシン三リン酸

dCTP：デオキシシチジン三リン酸

Gly又はG：グリシン

Ala又はA：アラニン

Val又はV：バリン

Leu又はL：ロイシン

Ile又はI：イソロイシン

Ser又はS：セリン

Thr又はT：スレオニン

Cys又はC：システイン

Met又はM：メチオニン

Glu又はE：グルタミン酸

Asp又はD：アスパラギン酸

Lys又はK：リジン

Arg又はR：アルギニン

His又はH：ヒスチジン

Phe又はF：フェニルアラニン

Tyr又はY：チロシン

Trp又はW：トリプトファン

Pro又はP：プロリン

Asn又はN：アスパラギン

Gln又はQ：グルタミン

【0124】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

- (配列番号：1) HREの核酸配列を示す。
- (配列番号：2) HREの核酸配列を示す。
- (配列番号：3) HREの核酸配列を示す。
- (配列番号：4) HREの核酸配列を示す。
- (配列番号：5) IL4REのコンセンサス核酸配列を示す。
- (配列番号：6) IL4REのコンセンサス核酸配列を示す。
- (配列番号：7) IL4REのコンセンサス核酸配列を示す。
- (配列番号：8) IL4REの核酸配列を示す。
- (配列番号：9) SV40の核酸配列を示す。
- (配列番号：10) 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸配列を示す。
- (配列番号：11) 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼのアミノ酸配列を示す。
- (配列番号：12) 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸配列を示す。
- (配列番号：13) 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼのアミノ酸配列を示す。
- (配列番号：14) 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸配列を示す。
- (配列番号：15) 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼのアミノ酸配列を示す。
- (配列番号：16) 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのプライマー塩基配列を示す。
- (配列番号：17) 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのプライマー塩基配列を示す。
- (配列番号：18) 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのプライマー塩基配列を示す。
- (配列番号：19) 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのオリゴDNA配列を示す。
- (配列番号：20) 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのオリゴDNA配列を示す。
- (配列番号：21) 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのオリゴDNA配列を示す。
- (配列番号：22) 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのオリゴDNA配列を示す。
- (配列番号：23) 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのオリゴDNA配列を示す。
- (配列番号：24) 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのオリゴDNA配列を示す。
- (配列番号：25) 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのオリゴDNA配列を示す。
- (配列番号：26) マルチクローニングサイト (MCS) の塩基配列を示す。
- (配列番号：27) マルチクローニングサイト (MCS) の塩基配列を示す。
- (配列番号：28) H I F - R e s p o n s e e l e m e n t (H R E) 作製のための核酸配列を示す。
- (配列番号：29) H I F - R e s p o n s e e l e m e n t (H R E) 作製のための核酸配列を示す。
- (配列番号：30) CMVプロモーターを得るためのプライマー塩基配列を示す。
- (配列番号：31) CMVプロモーターを得るためのプライマー塩基配列を示す。
- (配列番号：32) ヒトH1プロモーターを得るためのプライマー塩基配列を示す。
- (配列番号：33) ヒトH1プロモーターを得るためのプライマー塩基配列を示す。
- (配列番号：34) リンカーDNAの塩基配列を示す。
- (配列番号：35) リンカーDNAの塩基配列を示す。
- (配列番号：36) H I F - 1 α m R N Aの部分塩基配列を示す。
- (配列番号：37) H I F - 1 α d s R N A作製用オリゴDNAの塩基配列を示す。

- (配列番号：38) H I F-1 α d s R N A 作製用オリゴDNAの塩基配列を示す。
- (配列番号：39) CRBP2のプロモーター領域にあるRXRが結合する配列を作製するための塩基配列を示す。
- (配列番号：40) CRBP2のプロモーター領域にあるRXRが結合する配列を作製するための塩基配列を示す。
- (配列番号：41) I L 4 R E 作製のための核酸配列を示す。
- (配列番号：42) I L 4 R E 作製のための核酸配列を示す。
- (配列番号：43) S T A T 6 の核酸を得るためのプライマー塩基配列を示す。
- (配列番号：44) S T A T 6 の核酸を得るためのプライマー塩基配列を示す。

【実施例】

【0125】

以下に、具体的な例をもって本発明を示すが、本発明はこれに限られるものではない。

【実施例1】 PLAP basicベクタープラスミドの作製

TNF- α -PLAPベクタープラスミド (Goto, et. al. (1996) Molecular Pharmacology, 49:860-873) のTNF- α -promoter部分を除いて、代わりにマルチクローニングサイト (MCS) からなるポリヌクレオチドを挿入してPLAP basicベクタープラスミドを得た。より具体的には、配列番号：26および配列番号：27で示したオリゴDNAを作製し(株式会社日本バイオサービスに依頼)、それぞれ100 μ MになるようにTEバッファー(10 mM Tris-HCl p H 8.0, 1mM EDTA)で溶解した。この100 μ MのオリゴDNA溶液を25 μ lずつ混和して、95℃で10分間熱した後に、37℃ 1時間、室温 1時間で冷却してオリゴDNAをアニーリングさせ、MCS オリゴDNAを得た。オリゴDNAの塩基配列は以下のとおりである。

オリゴDNA：CGAGCTCTTACGCGTGCTAGCCCGGGCTCGAGA (配列番号：26)

オリゴDNA：AGCTTCTCGAGCCCGGGCTAGCAGCGCTAAGAGCTCGGTAC (配列番号：27)

次に、あらかじめKpn I およびHind IIIで切断しておいたTNF- α -PLAPベクタープラスミドにMCS オリゴDNAをリガーゼ反応(タカラバイオ株式会社、Cat. 6022)により挿入した。定法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems)により配列を確認し、PLAP basicベクタープラスミドを得た(図1)。

【0126】

【実施例2】 HRE-PLAPレポータープラスミドの作製

転写制御因子結合配列HREは、低酸素で転写促進活性が誘導されることが知られている (Kimura, et. al. (2001) The Journal of Biological Chemistry, 276: 2292-2298)。PLAP basicベクタープラスミドのKpn IサイトにHREからなるポリヌクレオチドを直列に3個挿入し、HREx3-PLAPを得た。より具体的には、VEGF遺伝子のプロモーター配列のHRE配列 (Forsythe, et. al. (1996) Molecular and Cellular Biology, 16(9): 4604-4613) を参考にして配列番号：28および配列番号：29で示したオリゴDNAを作製し(株式会社日本バイオサービスに依頼)、それぞれ100 μ MになるようにTEバッファー(10 mM Tris-HCl p H 8.0, 1mM EDTA)で溶解した。この100 μ MのオリゴDNA溶液を25 μ lずつ混和して、95℃で10分間熱した後に、37℃ 1時間、室温 1時間で冷却してオリゴDNAをアニーリングさせ、HREオリゴDNAを得た。オリゴDNAの塩基配列は以下の通りである。

オリゴDNA：CACAGTGCATACGTGGGCTCCAACAGGTCCTCTTCGTAC (配列番号：28)

オリゴDNA：GAAGAGGACCTGTTGGAGCCACGTATGCACTGTGGTAC (配列番号：29)

次に、PLAP basicベクターをKpn Iで切断して、HREオリゴDNA をリガーゼ反応(タカラバイオ株式会社、Cat. 6022)により挿入した。定法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、配列番号：28の3'側がPLAP basicベクタープラスミドのHind IIIサイト側に向いているクローンを選びHREx1-PLAPベクタープラスミドとした。さらにHREx1-PLAPベクタープラスミドをKpn Iで切断して、HREオリゴDNA をリガーゼ反応により挿入し、上記方法と同様にHREx2-PLAPベクタープラスミドを作製した。さらに、HREx2-PLAPベクタープラスミドをKpn Iで切断して、HREオリゴDNA をリガーゼ反応により挿入し、上記方法と同様にHREx3-PLAPベ

クタープラスミドを作製した。ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems)によりHREx3-PLAPベクタープラスミドの配列を確認した。その結果、タンデムに挿入された3個のHREのうち一つのHRE部分に1塩基の欠失が認められた、すなわち、配列番号：28の5'側から6 bp目のTが欠失していた。このTはHRE活性化には必須の塩基ではない (Kimura, et. al. (2001) The Journal of Biological Chemistry, 276: 2292-2298)ので、当該HREx3-PLAPベクタープラスミドを以下の実験に用いることにした。

【0127】

次に、pCDNA3.1/Hygro (+) (Invitrogen)のCMVプロモーター部分をPCR反応で増幅し、HREx3-PLAPベクタープラスミドのMlu I / Hind IIIサイトに挿入して、HRE-PLAPレポータープラスミドを得た。より具体的には、pCDNA3.1/Hygro (+)を鋳型とし、配列番号：30および配列番号：31で示したオリゴDNA (インビトロジェン株式会社に依頼して作製した)をプライマーとして、Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostic)を用い、(94℃ 30秒、60℃ 30秒、72℃ 60秒)を15回繰り返すことによりPCR反応を行った。プライマーの塩基配列は以下のとおりである。

プライマー：GGCGGTACGCGTGTACGGTGGGAGGTC (配列番号：30)

プライマー：TACCAAGCTTAAGTTTAAACGC (配列番号：31)

このPCR反応によって得られたDNA断片をMlu IおよびHind IIIで切断し、Mlu IおよびHind IIIで切断されたHREx3-PLAPベクタープラスミド中へ、リガーゼ反応 (タカラバイオ株式会社、Cat.6022)により挿入した。定法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems)により配列を確認し、HRE-PLAPレポータープラスミド (図2)を得た。

【0128】

【実施例3】 HRE-PLAPレポータープラスミド安定導入細胞の作製

実施例2で得たHRE-PLAPレポータープラスミドをヒト卵巣癌細胞株SK-OV-3細胞に導入し、低酸素によるPLAP発現誘導率の高いクローンをクローニングした。以下、詳細に記載する。

1. 細胞へのHRE-PLAPレポータープラスミドの導入

RPMI培養液で継代培養したSK-OV-3細胞 (American Type Culture Collection、HTB-77)を回収し、RPMI培養液を用いて 25×10^4 cells/mlになるように懸濁した。ここで、PRM I培養液とは、RPMI (SIGMA, R8758) 500 mlにPenicillin Streptomycin (Invitrogen, 15140-122) 5 ml、100mM Pyruvate (Invitrogen, 11360-070) 5 ml、2-Mercaptoethanol (Invitrogen, 21985-023) 500 μ lおよび56度で20分間熱処理して非働化した牛胎児血清 (三光純薬, No.3308-502) 50 mlを添加したものをいう (以下、同じ)。次に、当該細胞懸濁液を2 ml/wellずつ6 well細胞培養用プレート (Becton Dickinson Labware, 35-3046)に蒔き、CO₂インキュベーターにて培養した。翌日、OPTI-MEM I (Invitrogen, 31985-062) 100 μ lにFugene 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics Corporation) 4 μ lおよびHRE-PLAPレポータープラスミド2 μ gを加え、室温にて15分間インキュベートした後、細胞の培養上清に添加し、CO₂インキュベーターにて培養した。翌日、当該細胞をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし5 mlのRPMI培養液に懸濁した。径10 cmの細胞培養用シャーレ (Becton Dickinson Labware, 35-3003)に、RPMI培養液 11.2 mlおよび当該細胞懸濁液0.8 mlを添加して、CO₂インキュベーターにて培養を継続した。翌日、G-418 (Geneticin: Invitrogen)を最終濃度500 μ g/mlになるように培養上清に添加し、さらにCO₂インキュベーターにて培養を継続した。500 μ g/mlのG-418を含むRPMI培養液は3日毎に交換した。G-418を添加して培養してから11日目に、当該プレート上に形成された細胞塊 (コロニー)をそれぞれトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし24 well細胞培養用プレート (Becton Dickinson Labware, 35-3047)に移植しクローン化した。

【0129】

2. HRE-PLAPレポータープラスミド安定導入の確認

CO₂インキュベーターにて培養を継続し、クローン化した細胞がコンフルエントになっ

た時点で、トリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、PLAP測定用RPMI培養液500 μ lにて懸濁した。ここで、PLAP測定用RPMI培養液とは、RPMI (SIGMA, R8758) 500 mlにPenicillin Streptomycin (Invitrogen, 15140-122) 5 ml、100 mM Pyruvate (Invitrogen, 11360-070) 5 ml、2-Mercaptoethanol (Invitrogen, 21985-023) 500 μ lおよび65度で20分間熱処理して血清中のPLAP活性を失活させた牛胎児血清(三光純薬, No. 3308-502) 50 mlを添加した培養液をいう(以下、同じ)。次に、当該細胞懸濁液を50 μ l/wellずつ384 well細胞培養用プレート (Greiner, 781182) 2枚にまいて、正常酸素濃度(21%)のCO₂インキュベーターで培養した。翌日、1枚のプレートを、酸素濃度を2%に設定した低酸素インキュベーター(タバイエスベック、BNP110M)に移して培養した。もう1枚のプレートは正常酸素濃度のCO₂インキュベーターで培養した。

翌日、培養上清中のPLAP活性を測定し、転写活性の指標とした。より具体的には、Lumi-Phos 530 (Lumigen, Inc.)とPLAP buffer (0.28 M Na₂CO₃-NaHCO₃ pH 10.0, 8 mM MgSO₄)を等量混和して基質溶液とした。次に、ELISA用ホワイトプレート(住友ベークライト株式会社、品番MS-8496W)に基質溶液100 μ lを添加し、ここに培養上清10 μ lを添加して、混和した。続いて、遮光して、室温で1時間インキュベートした後に、プレートリーダー(Perkin Elmer, ARVO)を用いて化学発光強度を測定した。各クローンについて、この過程を繰り返し、通常酸素濃度(21%)条件下に比べて低酸素濃度(2%)条件下において、より高いPLAP活性が誘導されるクローンA3(図3)を得た。以降、当該クローンA3をSK-OV-3/HRE-PLAP(A3)と記載する。

【0130】

【実施例4】In vivoにおけるHRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞の転写活性測定(皮下移植)

1. マウスにおけるHRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞の移植および血液採取

500 μ g/mlのG-418を含むRPMI培養液で継代培養したSK-OV-3/HRE-PLAP(A3)(実施例3)をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、 5×10^7 cells/mlになるようにRPMI培養液にて懸濁した。100 μ lの細胞懸濁液(5×10^6 cells/mouse)をBALB/cヌードマウス(雌性、7週齢、日本クレアより購入)の皮下に、ツベルクリン用1 ml注射筒(26G針付)を用いて移植した。移植日を含め連日、ヘパリンコート・ヘマトクリット管(ドラモンド社製)を用いて眼窩採血を行った。ヘマトクリット管は専用パテ(テルモ社製)にて片端を閉じた。採血した血液は、ヘマトクリット管用遠心機(トミー精工、RC-24BN)にて10,000 rpm、2分間の遠心処理を行い、血漿画分を分離した。血漿は、生理食塩水で10倍に希釈して10倍希釈血漿とし、PLAP活性を測定するときまで-20℃にて凍結保存した。

また、移植したSK-OV-3/HRE-PLAP(A3)からなる腫瘍の大きさと血中PLAP活性の関係を調べるため、腫瘍の短径(mm)および長径(mm)を電子デジタルノギスで計測し、以下に示す計算式により腫瘍体積を求めた。

$$\text{腫瘍体積(mm}^3\text{)} = \text{長径(mm)} \times \text{短径(mm)} \times \text{短径(mm)} / 2$$

【0131】

2. 血中PLAP活性の測定

10倍希釈血漿を室温で融解した後に、乾熱滅菌機(東京理科機械、WF0-600SD)で65℃、1時間熱処理して、内在性のアルカリフォスファターゼを不活化した。次に、熱処理後の10倍希釈血漿をPLAP buffer (0.28 M Na₂CO₃-NaHCO₃ pH 10.0, 8 mM MgSO₄)で10倍に希釈して100倍希釈血漿とした。

一方、Lumi-Phos 530 (Lumigen, Inc.)とPLAP buffer (0.28 M Na₂CO₃-NaHCO₃ pH 10.0, 8 mM MgSO₄)を等量混和して基質溶液とした。次に、ELISA用ホワイトプレート(住友ベークライト株式会社、品番MS-8496W)に基質溶液を100 μ l添加し、ここに100倍希釈血漿を10 μ l添加して、混和した。続いて、遮光して、室温で1時間インキュベートした後に、プレートリーダー(Perkin Elmer, ARVO)を用いて化学発光強度を測定し、血中PLAP活性の指標として用いた。

その結果、血中PLAP活性は、SK-OV-3/HRE-PLAP(A3)移植前には1000 units以下だったが、移植翌日より上昇し、一度減少した後、SK-OV-3/HRE-PLAP(A3)からなる腫瘍増殖と

ともに再上昇するという二相性の変化を示した(図4)。移植直後には腫瘍内には血管が存在しないため、腫瘍内は低酸素となり、HREを介した転写活性が誘導され、HRE-PLAPレポータープラスミドの転写活性が亢進したために、血中PLAP活性が上昇したと考えられる。また、その後、血管新生が起こり、腫瘍内酸素濃度が上昇したために、HREを介した転写活性が抑制され、血中PLAP活性が減少し、その後、腫瘍細胞数の増加とともに血中PLAP活性が上昇したと考えられる。

以上の結果から、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、当該非ヒト動物モデルにおける分泌タンパク質量を測定することにより、非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性を測定することができることが明らかになった。

【0132】

【実施例5】 dsRNA発現ベクタープラスミドの調製

HREを介した転写調節においては、転写因子HIF-1がHREに結合することにより転写が活性化されることが知られている(Harris (2002) Nature Reviews Cancer, 2:38-47)。転写因子HIF-1はHIF-1 α とHIF-1 β のヘテロダイマーである(Harris (2002) Nature Reviews Cancer, 2: 38-47)。実施例4で認められた血中PLAP活性がHIF-1に依存した生理的なものであるか確認するために、HIF-1 α -dsRNA発現ベクタープラスミドを作製した。

ここで、dsRNAとは、double strand RNAのことであり、RNA干渉(Fire, et. al. (1998) Nature, 391:806-811、以下、RNAiと称する場合がある)を引き起こす二本鎖RNAをいう。

以下、詳細に説明する。

【0133】

1. ヒトゲノムDNAからのヒトH1プロモーターのクローニング

ヒトゲノムDNA (Roche Diagnostics Corporation)を鋳型とし、配列番号: 32および配列番号: 33で示したオリゴDNA(インビトロジェン株式会社に依頼して作製した)をプライマーとして、Pfuポリメラーゼ(Promega)を用い、(95℃ 30秒、60℃ 30秒、72℃ 3分)を35回繰り返すことによりPCR反応を行って、ヒトH1プロモーターからなるDNA断片を増幅した。

プライマー: ACAGAATTGGAACGCTGACGTCATCA (配列番号: 32)

プライマー: GAAAGCTTGGTAGATCTGTGGTCTCATACAGAACTTATAAGAT (配列番号: 33)

当該DNA断片をEcoRIおよびHindIIIで切断し、あらかじめEcoRIおよびHindIIIで切断しておいたpUC18(東洋紡績株式会社)にリガーゼ反応により挿入した。定法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems)により配列を確認し、pUC18/H1プロモーターを得た。

【0134】

2. dsRNA発現ベクタープラスミドの作製

配列番号: 34および配列番号: 35で示したオリゴDNAを作製し(インビトロジェン株式会社に依頼)、それぞれ100 μ MになるようにTEバッファー(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA)で溶解した。この100 μ MのオリゴDNA溶液を25 μ lずつ混和して、90℃で2分間熱した後に、37℃ 1時間、室温 1時間で冷却することでアニーリングさせ、両端にそれぞれXbaIおよびEcoRIサイトを持つリンカーDNA断片を得た。オリゴDNAの塩基配列は以下のとおりである。

オリゴDNA: CTAGAGGTACCAGCTGCTAGCG (配列番号: 34)

オリゴDNA: AATTCGCTAGCAGCTGGTACCT (配列番号: 35)

pUC18/H1プロモーターをEcoRIおよびHindIIIで切断し、H1プロモーター断片を得た。当該H1プロモーター断片と当該リンカーDNA断片とをあらかじめXbaIおよびHindIIIで切断したpREP7(Invitrogen)にリガーゼ反応により挿入した。定法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems)により配列を確認し、dsRNA発現ベクタープラスミドpREP-H1(図5)を得た。

【0135】

【実施例6】 HIF-1 α dsRNA発現ベクタープラスミドの調製

配列番号：36に示したHIF-1 α mRNAの部分配列をもとに配列番号：37および配列番号：38で示したオリゴDNAを作製し（インビトロジェン株式会社に依頼）、それぞれ100 μ M になるようにTEバッファー（10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA）で溶解した。この100 μ MのオリゴDNA溶液を25 μ lずつ混和して、90℃で2分間熱した後、37℃ 1時間、室温 1時間で冷却することでアニーリングさせ、HIF-1 α dsRNA発現用DNA断片を得た。RNAおよびオリゴDNAの塩基配列は以下のとおりである。

mRNA配列：GAUAAGUUCUGAACGUCGA（配列番号36）

オリゴDNA：

GATCCCCGATAAGTTCTGAACGTCGATTCAAGAGATCGACGTTTCAGAACTTATCTTTTTGGAAA（配列番号37）

オリゴDNA：

AGCTTTTCCAAAAAGATAAGTTCTGAACGTCGATCTCTTGAATCGACGTTTCAGAACTTATCGGG（配列番号38）

実施例5で得られたpREP-H1を、BglIIIとHindIIIで切断し、当該HIF-1 α dsRNA発現用DNA断片をリガーゼ反応（TAKARA, Cat. 6022）により挿入した。定法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit（Applied Biosystems）により配列を確認し、HIF-1 α dsRNA発現ベクタープラスミドpREP-H1-HIF1RNAi（図6）を得た。

【0136】

【実施例7】 HIF-1 α dsRNA発現ベクタープラスミド安定導入細胞の調製

実施例3で得たHRE-PLAPレポータープラスミド安定導入細胞SK-OV-3/HRE-PLAP(A3)に実施例6で得たHIF-1 α dsRNA発現ベクタープラスミドpREP-H1-HIF1RNAiをトランスフェクションして、安定導入細胞をクローン化した。

以下、詳細に記載する。

【0137】

1. SK-OV-3/HRE-PLAP(A3)へのpREP-H1-HIF1RNAiの導入

500 μ g/mlのG-418を含むRPMI培養液で継代培養したSK-OV-3/HRE-PLAP(A3)を回収し、RPMI培養液を用いて 2.5×10^5 cells/mlになるように懸濁した。次に、当該細胞懸濁液を2 ml/wellずつ6 well細胞培養用プレート（Becton Dickinson Labware, 35-3046）に蒔き、CO₂インキュベーターにて培養した。翌日（2日目）、OPTI-MEM 1（Invitrogen, 31985-062）100 μ lにFugene 6 Transfection Reagent（Roche Diagnostics Corporation）4 μ lおよびpREP-H1-HIF1RNAi 2 μ gを加え、室温にて15分間インキュベートした後、細胞の培養上清に添加し、CO₂インキュベーターにて培養した。4日目に、トランスフェクションした細胞をトリプシン-EDTA処理して回収し、RPMI培養液5 mlに懸濁した。径10 cmの細胞培養用シャーレ（Becton Dickinson Labware, 35-3003）に、RPMI培養液 11.5 mlおよび当該懸濁液0.5 mlを添加して、CO₂インキュベーターにて培養を継続した。7日目に、ハイグロマイシンB（Invitrogen）を最終濃度200 μ g/mlになるようにRPMI培養上清に添加し、CO₂インキュベーターにて培養を継続した。200 μ g/mlのハイグロマイシンBを含む培養液は3日毎に交換した。21日目以降、当該プレート上に形成された細胞塊（コロニー）をそれぞれトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし24 well細胞培養用プレート（Becton Dickinson Labware, 35-3047）に移植しクローン化した。

【0138】

2. pREP-H1-HIF1RNAiの安定導入の確認

CO₂インキュベーターにて培養を継続し、単離されたそれぞれのクローンが十分量増殖し、コンフルエントになった時点で、一部を96 well細胞培養用プレート（Corning, 3628）に蒔きなおし、2%低酸素下で一晩培養し、培養上清のPLAP活性を測定した。それぞれのクローンについて、この過程を繰り返し、2%低酸素下でのPLAP活性が低いクローン2D4を得た（図7）。一方、上記方法と同様にSK-OV-3/HRE-PLAP(A3)にpREP-H1をトランスフェクションして、クローニングして、クローンMD2を得た（図7）。

【0139】

前項で得た各クローンにおいてRNAi効果によりHIF-1 α mRNAが減少しているか調べるために、各クローンから全RNAをRNA抽出キットRNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて調製し、リアルタイムPCR解析を行いHIF-1 α のmRNA量を定量した。より具体的には、TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems社、N808-0234)を用いて450 ngのRNAをRandom Hexamersプライマーを用いて50 μ lの反応液中でcDNAに逆転写した。反応終了後、反応液を蒸留水で3倍に薄めてcDNA溶液とした。cDNA溶液 10 μ lにTaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems社、4304437) 12.5 μ l, HIF-1 α 用20X Assay-on-DemandTM Gene Expression Assay Mix (Applied Biosystems社、4331182, Hs00153153-m1) または β -actin用アッセイミックス (Applied Biosystems社、4310881E) 1.25 μ l、蒸留水1.25 μ lを添加し、ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems)によってリアルタイムPCRを行い、Comparative Ct法 (Applied Biosystems Prism 7 700 Users Bulletin No.2) によって結果を解析してHIF-1 α mRNAおよび β -actin mRNA量を定量した。求めたHIF-1 α mRNA量を β -actin mRNA量で除して補正した。

この結果、pREP-H1-HIF1RNAiをトランスフェクションしたクローン2D4では、RNAiを引き起こす配列を含まずベクターのみのpREP-H1をトランスフェクションしたクローンMD2に比べて、HIF-1 α mRNAの発現が95%以上抑制されていることが確認されたので(図8)、以降の実験に用いることとした。

【0140】

【実施例8】 RNAiによるHIF-1 α の抑制が、in vivoにおけるHRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞の転写活性に及ぼす影響

500 μ g/mlのG-418および200 μ g/mlのハイグロマイシンBを含むRPMI培養液で継代培養したクローン2D4およびクローンMD2(実施例7)をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、RPMI培養液を用いて5 \times 10⁷ cells/mlになるように懸濁した。200 μ lの細胞懸濁液(2 \times 10⁶ cells/mouse)をBALB/cヌードマウス CD-1ヌードマウス(雌性、9週齢、日本チャールズリバーより購入)の皮下に、ツベルクリン用1 ml注射筒(26G針付)を用いて移植した。移植日を含め連日、ヘパリンコート・ヘマトクリット管(ドラモンド社製)を用いて眼窩採血を行った。ヘマトクリット管は専用パテ(テルモ社製)にて片端を閉じた。採血した血液は、ヘマトクリット管用遠心機にて10,000 rpm、2分間の遠心処理を行い、血漿画分を分離した。血漿は、生理食塩水で10倍に希釈して10倍希釈血漿とし、PLAP活性測定まで-20℃にて凍結保存した。クローン2D4およびクローンMD2からなる腫瘍体積の測定と血漿中PLAP活性の測定は実施例4に示した方法で行った。

その結果、コントロールのクローンMD2では移植直後血中PLAP活性が上昇したが、RNAiによってHIF-1 α の発現を抑制したクローン2D4では移植直後の血中PLAP活性の上昇が抑制されていた(図9)。よって、実施例4で認められたHRE-PLAPレポータープラスミドによる血中PLAP活性の上昇はHIF-1に依存したものであることが示された。よって、PLAP活性は、転写制御配列の転写活性を反映したものであり、PLAP活性を測定することで、転写制御配列の転写活性測定することができることが明らかになった。

【0141】

【実施例9】抗VEGF抗体の投与による、in vivoにおけるHRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞の転写活性に及ぼす影響

非ヒト動物モデルにおいて、血中PLAP活性を測定することで移植した細胞中の転写活性を測定できることを確認するために、以下の実験を行った。

0.5%以上の酸素濃度では、酸素濃度が下がるほどHIF-1量が増加することが報告されている(Jiang, et. al. (1996) Am. J. Physiol, 271:C1172-C1180)。一方、抗VEGF抗体投与により血管新生が阻害され、腫瘍内酸素濃度が低下すると考えられる(Blagosklonny (2004) Cancer Cell, 5:13-17)。そこで、in vivoにおいて、HRE-PLAPの転写活性が腫瘍内の酸素濃度低下により誘導されることを、血中PLAP活性を指標にすることで測定できるかどうかを調べるために、HRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞を皮下移植したヌードマウスに、抗VEGF抗体を投与して、血中PLAP活性の経時変化を調べた。

【0142】

より具体的には、500 $\mu\text{g/ml}$ のG-418を含むRPMI培養液で継代培養したSK-OV-3/HRE-PLAP(A3)（実施例3）をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、RPMI培養液を用いて 5×10^7 cells/mlとなるように懸濁した。次に、100 μl の細胞懸濁液（ 5×10^6 cells/mouse）をBALB/cヌードマウス（雌性、7週齢、日本クレアより購入）の皮下に、ツベルクリン用1 ml注射筒（26G針付）を用いて移植した。移植10日後より4日毎に抗VEGF抗体（R&D社、MAb 293）100 $\mu\text{g/head}$ を静脈内投与した。投与開始日より、ヘパリンコート・ヘマトクリット管（ドラモンド社製）を用いて眼窩採血を行った。ヘマトクリット管は専用パテ（テルモ社製）にて片端を閉じた。採血した血液は、ヘマトクリット管用遠心機にて10,000 rpm、2分間の遠心処理を行い、血漿画分を分離した。血漿は、生理食塩水で10倍に希釈して10倍希釈血漿とし、PLAP活性測定まで -20°C にて凍結保存した。SK-OV-3/HRE-PLAP(A3)からなる腫瘍体積の測定と血漿中PLAP活性の測定は実施例4に示した方法で行った。

【0143】

その結果、抗VEGF抗体投与群（5匹）の腫瘍体積がコントロール群（5匹）と差が無かったにもかかわらず、抗VEGF抗体投与群の血中PLAP活性はコントロール群よりも高値であった（図10）。抗VEGF抗体投与により血管新生が阻害され、腫瘍内酸素濃度が低下すると考えられるが、この腫瘍内酸素濃度の低下に応答してHRE-PLAPの転写活性が上昇した結果、血中PLAP活性が増加したと考えられる。よって、この非ヒト動物モデルでは血中PLAP活性をモニターすることで、細胞内の酸素濃度をモニターすることが可能であると考えられる。

以上の結果からも、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、得られた非ヒト動物モデルにおける分泌タンパク質量を測定することにより、非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性を測定することができることが明らかになった。

【0144】

【実施例10】 In vivoにおけるHRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞の転写活性測定（腹腔内移植）

500 $\mu\text{g/ml}$ のG-418を含むRPMI培養液で継代培養したSK-OV-3/HRE-PLAP(A3)（実施例3）をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、RPMI培養液を用いて 1×10^7 cells/mlとなるように懸濁した。200 μl の細胞懸濁液（ 2×10^6 cells/mouse）をBALB/cヌードマウス（雌性、7週齢、日本チャールズリバーより購入）の腹腔内に、ツベルクリン用1 ml注射筒（26G針付）を用いて移植した。移植日を含め連日、ヘパリンコート・ヘマトクリット管（ドラモンド社製）を用いて眼窩採血を行った。ヘマトクリット管は専用パテ（テルモ社製）にて片端を閉じた。採血した血液は、ヘマトクリット管用遠心機にて10,000 rpm、2分間の遠心処理を行い、血漿画分を分離した。血漿は、生理食塩水で10倍に希釈して10倍希釈血漿とし、PLAP活性測定まで -20°C にて凍結保存した。SK-OV-3/HRE-PLAP(A3)からなる腫瘍体積の測定と血漿中PLAP活性の測定は実施例4に示した方法で行った。

【0145】

その結果、血中PLAP活性は、皮下移植実験（実施例4）と同様に、腫瘍細胞移植前には1000 units以下だったが、移植翌日より上昇し、一度減少した後に再上昇するという二相性の変化を示した（図11）。5匹中2匹はPLAPの上昇が遅くこれは腫瘍の生着率によると考えられる。

以上の結果からも、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、当該非ヒト動物モデルにおける分泌タンパク質量を測定することにより、非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性を測定することができることが明らかになった。

また、移植部位は、皮下のみならず腹腔内でも可能であることが示された。

【0146】

【実施例11】 In vivoにおけるVEGF-PLAPレポータープラスミド導入細胞の転写活性測定（頭蓋内移植）

PLAP basicベクタープラスミドのKpnI / NheIサイトにVEGF遺伝子のプロモーター配列からなるポリヌクレオチドを挿入したVEGF-PLAPレポータープラスミド（図12）をヒト

脳腫瘍株U-251（理化学研究所細胞バンク、RCB0461）に安定導入したU251/VEGF-PLAP（Mizui, et. al. (2004) The Journal of antibiotics, 57: 188-196）をマウスの頭蓋内に移植し、血中PLAP活性を測定した。より具体的には、500 μ g/mlのG-418を含むRPMI培養液で継代培養したU251/VEGF-PLAPをトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、2%メチルセルロースを用いて 1×10^7 cells/mlになるように懸濁した。10 μ lの細胞懸濁液（ 1×10^5 cells/mouse）をBALB/cヌードマウス（雌性、12週齢、日本チャールズリバーより購入、10 mg/ml ケタミン・13.4 mg/ml キシラジン・6.4 μ g/ml アセプロマジン溶液を70 μ l / headの0.1 ml 腹腔内投与により麻酔）の頭蓋下に、25 μ lハミルトンシリンジを用いて移植した。移植日を含め連日、ヘパリンコート・ヘマトクリット管（ドラモンド社製）を用いて眼窩採血を行った。ヘマトクリット管は専用パテ（テルモ社製）にて片端を閉じた。採血した血液は、ヘマトクリット管用遠心機にて10,000 rpm、2分間の遠心処理を行い、血漿画分を分離した。血漿は、生理食塩水で10倍に希釈して10倍希釈血漿とし、PLAP活性測定まで-20℃にて凍結保存した。U251/VEGF-PLAPからなる腫瘍体積の測定と血漿中PLAP活性の測定は実施例4に示した方法で行った。

その結果、血中PLAP活性は、HRE-PLAPレポータープラスミドを導入したSK-OV-3を皮下移植した場合（実施例4）と同様に、腫瘍細胞移植前には1000 units以下だったが、移植翌日より上昇し、一度減少した後に再上昇するという二相性の変化を示した（図13）。

【0147】

以上の結果からも、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、当該非ヒト動物モデルにおける分泌タンパク質量を測定することにより、非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性を測定することができることが明らかになった。

また、移植部位は、皮下のみならず頭蓋内でも可能であることが示された。

さらには、転写制御配列は、HREに限定されないことが示された。

【0148】

次に、HREとは異なる転写制御因子結合配列を有するプロモーターにおいても、移植細胞中の転写活性を測定できることを確認するために、以下の実験を行った。

IL-4は、細胞表面にあるIL-4Rを介してSTAT6を活性化し、STAT6のホモダイマーを形成させることが知られている（Jinzhaoh Hou, et. Al. (1994), Science, vol265 (16):1701-1706）。また、STAT6は、ホモダイマーを形成することによって、エンハンサーであるIL4RE（Richard Moriggl, et. al. (1997) Molecular and cellular Biology, vol17:3663-3678）に結合し、転写活性を調節することが知られている（Helen Kotanides, et. Al. (1996), The Journal of Biological Chemistry, vol.271(41):25555-25561）。

そこで、非ヒト動物モデルにおいて、血中PLAP活性を測定することで移植した細胞中の転写活性を測定できることを確認するために、以下の実験を行った。

【0149】

【実施例12】 STAT6-PLAP レポータープラスミドの作製

HIV-1 kb-PLAPベクタープラスミド（MOLECULAR PHARMACOLOGY, 49:860-873 (1996)）を制限酵素Spe IおよびXba Iで消化した。次に、アルカリフォスファターゼ（TaKaRa, 2120 B）にて脱リン酸化した後、アガロースゲルにて電気泳動を行った。電気泳動後、当該アガロースゲルから約5.5 kbpのバンドを切り出し、「SUPREC-01」（TaKaRa, 9040）を用いてDNAフラグメントを抽出し、これをTK-PLAPベクターフラグメントとした。

【0150】

次に、Cellular Retinoid Binding Protein 2（以下、CRBP2と称する場合がある）のプロモーター領域にあるRXRが結合するDNA領域を、前述のTK-PLAPベクターフラグメントに挿入した。より具体的には、配列番号：39および配列番号：40に示したオリゴDNA（株式会社日本バイオサービスに依頼）をT4ポリヌクレオチドキナーゼ（TOYOBO, PNK-103）で処理した後、0.1M NaClとなるようにNaClを加え、65℃、10分の後、室温にて冷却し、アニーリングさせた。次に、TK-PLAPベクターフラグメントに当該オリゴDNAをリガーゼ反応（タカラバイオ株式会社、Cat.6022）により挿入した。定法により、当該プラスミド

を大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems)により配列を確認し、pCRBP2x2-tkPLAPベクターを得た(図14)。

オリゴDNA: CTAGTCAGGTCACAGGTCACAGGTCACAGTTCAAT (配列番号: 39)

オリゴDNA: CTAGATTGAACTGTGACCTGTGACCTGTGACCTGA (配列番号: 40)

次に、pCRBP2x2-tkPLAPベクターからCRBP2x2-TK promoter部位を切り出した。より具体的には、pCRBP2x2-tkPLAPベクターを制限酵素Spe IおよびHind IIIで消化し、アガロースゲルにて電気泳動を行った。電気泳動後、当該アガロースゲルから約200bpのバンドを切り出し、「SUPREC-01」(TaKaRa, 9040)を用いてDNAフラグメントにて抽出し、これをCRBP2x2-TK promoterフラグメントとした。次に、制限酵素Nhe IおよびHind IIIで消化したPLAP basicベクターに、CRBP2x2-TK promoterフラグメントをリガーゼ反応(タカラバイオ株式会社、Cat.6022)により挿入した。定法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems)により配列を確認し、pCRBP2x2-TK promoter-PLAP basicベクターを得た(図15)。

【0151】

続いて、pCRBP2x2-TK promoter-PLAP basicベクターのpCRBP2x2部分を除いて、IL4REのオリゴDNAを挿入してSTAT6-PLAP レポータープラスミドを得た。より具体的には、配列番号: 41および配列番号: 42で示したオリゴDNAを作製し(Pharmacia biotechに依頼)、それぞれ100 μ MになるようにTEバッファー(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA)で溶解した。この100 μ MのオリゴDNA溶液を25 μ lずつ混和して、95℃で10分間熱した後、37℃ 1時間、室温 1時間で冷却してオリゴDNAをアニーリングさせ、IL4REオリゴDNAを得た。オリゴDNAの塩基配列は以下のとおりである。

オリゴDNA:

AGCGGTACCTCGACTTCCCAAGAACAGAATCGACTTCCCAAGAACAGAATCGACTTCCCAAGAACAGAATCTAGAGCT (配列番号: 41)

オリゴDNA:

AGCTCTAGATTCTGTTCTTGGGAAGTCGATTCTGTTCTTGGGAAGTCGATTCTGTTCTTGGGAAGTCGAGGTACCGCT (配列番号: 42)

IL4REオリゴDNAを制限酵素KpnIおよびXbaIにて消化した。

次に、pCRBP2x2-TK promoter-PLAP basicベクターを制限酵素KpnIおよびXbaIにて消化し、アガロースゲルにて電気泳動を行った。電気泳動後、当該アガロースゲルから約6.9kbpのバンドを切り出し、「SUPREC-01」(TaKaRa, 9040)を用いてDNAフラグメントにて抽出し、これをTK promoter-PLAP basicベクターフラグメントとした。次に、当該TK promoter-PLAP basicベクターフラグメントに、制限酵素KpnIおよびXbaIにて消化したIL4REオリゴDNAをリガーゼ反応(タカラバイオ株式会社、Cat.6022)により挿入した。定法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems)により配列を確認し、STAT6-PLAPレポータープラスミドを得た(図16)。

【0152】

【実施例13】STAT6発現 ベクタープラスミドの作製

ヒト末梢血単核球細胞をヒト健常人血液より調製し、Rneasy kit(QIAGEN社)にてRNAを抽出した。次に、TAKARA RNA LA PCR kit (TAKARA)を用いて、当該キットの操作方法にしたがいで逆転写反応(42℃ 45分、99℃ 5分)を行い、cDNAを得た。

次に、ヒトSTAT6遺伝子をクローニングするために、上記操作で得たcDNAを鋳型にしてTAKARA LA PCR kitおよび配列番号: 43および配列番号: 44で示したオリゴDNA(日本バイオサービスより購入)を用いてPCR反応を行った。PCR条件は、94℃ 5分の反応を行った後、98℃ 1分、60℃ 1分、73℃ 3分の反応を30サイクル行った後、73℃ 10分反応を行い、伸張反応を完全に行った。プライマーの配列は、以下の通りである。

プライマー: CGGAATTCATGTCTCTGTGGGGTCTGGTCTCCA (配列番号: 43)

プライマー：GCTCTAGATCACCACCTGGGGTTGGCCCTTAGG（配列番号：44）

続いて、当該PCR産物を制限酵素EcoRIおよびXbaIで消化し、同じく制限酵素EcoRIおよびXbaIで消化したpBscript SK(+)プラスミド（TOYOBO）にリガーゼ反応（タカラバイオ株式会社、Cat.6022）により挿入した。定法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit（Applied Biosystems）により配列を確認し、pBscript SK(+)/STAT6プラスミドを得た。

次に、定法により、pBscript SK(+)/STAT6プラスミドを制限酵素EcoRIおよびXbaIで消化しSTAT6遺伝子を切り出し、制限酵素EcoRIおよびXbaIで消化したpcDNA3.1(+)プラスミド（Invitrogen）にリガーゼ反応（タカラバイオ株式会社、Cat.6022）により挿入した。定法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit（Applied Biosystems）により配列を確認し、STAT6発現ベクタープラスミドを得た（図17）。

【0153】

【実施例14】STAT6-PLAP レポータープラスミドおよびSTAT6発現ベクタープラスミド安定導入細胞の作製

実施例12および13で得たSTAT6-PLAP レポータープラスミドおよびSTAT6発現ベクタープラスミドをヒト胎児腎臓細胞HEK293細胞（ATCC1573）に導入し、IL4によるPLAP発現誘導率の高いクローンをクローニングした。以下詳細に記載する。

DMEM培養液で継代培養したHEK293細胞を回収し、DMEM培養液を用いて 1.0×10^5 cells/mlになるように懸濁した。ここで、DMEM培養液とは、DMEM（SIGMA, D6429）500 mlにPenicillin Streptomycin（Invitrogen, 15140-122）5 mlおよび56度で20分間熱処理して非働化した牛胎児血清 50 mlを添加したものをいう（以下同じ）。次に、当該細胞懸濁液を3 ml/wellずつ6 well細胞培養用プレート（Becton Dickinson Labware, 35-3046）に蒔き、CO₂インキュベーターにて培養した。翌日、OPTI-MEM I（Invitrogen, 31985-062）溶液で細胞を洗浄し、1.5mlのOPTI-MEM I溶液を加えた。OPTI-MEM I溶液274 μ lに500 μ g/mlのSTAT6-PLAP レポータープラスミドおよび500 μ g/mlのSTAT6発現ベクタープラスミドを3 μ lずつ添加した。その後Lipofectamine（Invitrogen, 18324-012）溶液20 μ lを加え、室温で20分間インキュベートした。次に、1.2mlのOPTI-MEM I溶液を加え、計1.5mlの溶液を細胞の培養上清に添加し、CO₂インキュベーターにて2時間培養した。最終濃度が20%となるようにFCSを加えたDMEM培養液1.5mlを細胞培養液に加え、さらにCO₂インキュベーターにて培養した。翌日、当該細胞をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、G-418（Geneticin：Invitrogen）が最終濃度1mg/ml含まれているDMEM培養液に5 cells/mlとなるように細胞を懸濁し、200 μ lずつ1個/wellとなるように96well細胞用培養プレート（Becton Dickinson Labware, 35-3072）に細胞を蒔き、STAT6-PLAP レポータープラスミドおよびSTAT6発現ベクタープラスミド安定導入クローン化細胞を選択した。

【0154】

次に、クローン化した細胞がIL4の刺激によりPLAP活性が上昇するか否かを検討した。より具体的には、クローン化した細胞を、トリプシン-EDTA処理して器壁からはがしDMEM培養液に懸濁し、 1.0×10^4 cells/190 μ l/wellとなるように96well細胞用培養プレートに細胞を蒔いた。翌日、ヒトIL4（カルピオケム、407635）を最終濃度が1ng/mlとなるように20ng/mlのヒトIL4を10 μ l細胞培養液に添加した。翌日、培養上清を回収し、培養上清中のPLAP活性を測定した。

より具体的には、ELISA用ブラックプレート（住友ベークライト株式会社、品番MS-8496 K）にPLAP buffer（0.28 M Na₂CO₃-NaHCO₃ pH 10.0, 8 mM MgSO₄）を100 μ l添加し、そこに65℃の湯浴中で10分間処理した培養上清を10 μ l添加した。ここにLumi-Phos 530（Lumigen, Inc.）50 μ l添加し、混和した。続いて、遮光して、室温で1時間インキュベートした後、プレートリーダー（Perkin Elmer, ARVO）を用いて化学発光強度を測定した。その結果、図18に示すとおりIL4刺激により非刺激条件に比べ高いPLAP活性を誘導するクローンを得た。以降、当該クローンをE9細胞と記述する。

【0155】

[実施例15] E9細胞導入によるマウス空気嚢 (Air pouch) モデルの作製

5% cytodex3 (Amersham Bioscience, 17-0485-01) 溶液および2% カルボキシメチルセルロース (以下、CMCと称する場合がある) 溶液 (第一工業製薬株式会社) を調製した。より具体的には、5 gのcytodex3を100 mlのPBS (SIGMA, R8537) で懸濁し、オートクレーブにより滅菌操作を行った。また、2% CMC溶液は、100 mlのPBSにスターラーバーで攪拌しながらCMCを2 g加え、その後オートクレーブにより滅菌操作を行い調製した。

次に、E9細胞をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、 1.0×10^6 cells/mlとなるようにDMEM培養液に細胞を懸濁した。 1.0×10^7 cellsのE9細胞に対し0.2 gのcytodex3を混和した。より具体的には、 1.0×10^6 cells/mlの細胞懸濁液10 mlに対し、4 mlの5% cytodex3溶液を混和した。次に、細胞/cytodex3懸濁液をnon-tissue culture plate (IWAKI, SH90-15) に蒔き、CO₂ インキュベーターにて培養した。翌日、細胞を回収し、遠心操作を行い、上清を除いた。 2.0×10^6 cells/ml となるようにDMEM培養液を加え、さらに等量の2% CMC溶液を加え、細胞濃度が 1.0×10^6 cells/ml、CMCの最終濃度が1%となるように細胞を調製した。

【0156】

ジエチルエーテル (WAKO, 055-01155) 麻酔下にて、CDF1マウス (日本チャールズリバー) に27G針付き5 mlのテルモシリンジでマウスの背部皮下に3 ml空気をいれ、空気嚢を作成した。次に、細胞懸濁液2 mlを22G針付きシリンジにて空気嚢内に移入した。具体的には、マウス一匹あたり 2.0×10^6 cellsの細胞を移入した。次に、1% CMCで3 ng/mlとなるように調製したヒトIL4 (カルビオケム、407635) 1 mlを22G針付きシリンジにてマウスの空気嚢内に移入し、よく混和した。24時間後、ヘパリン処理済みのテルモヘマトクリット毛細管 (TERUMO, VC-H075H) を用いて眼窩採血を行った。採血した血液は、遠心機にて3,000回転、10分間遠心分離を行い、血漿画分を得た。内在性のアルカリフォスファターゼを失活させるために、血漿サンプルを65℃の湯浴中で10分間処理し、血漿中のE9細胞由来のPLAP活性を測定した。より具体的には、ELISA用ブラックプレート (住友ベークライト株式会社、品番MS-8496K) にPLAP buffer (0.28 M Na₂CO₃-NaHCO₃ pH 10.0, 8 mM MgSO₄) を40 μ l添加し、血漿サンプル10 μ lを添加した。ここにLumi-Phos 530 (Lumigen, Inc.) 50 μ lを添加して、混和した。続いて、遮光して、室温で1時間インキュベートした後、プレートリーダー (Perkin Elmer, ARVO) を用いて化学発光強度を測定した。その結果、IL4刺激により、血中に分泌されたPLAP活性が顕著に上昇することを検出することができた (図19)。

【0157】

以上の結果から、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、当該非ヒト動物モデルにおける分泌タンパク質量を測定することにより、非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性を測定することができることが明らかになった。

また、移植において、担体を用いることも可能であることが示された。

さらには、転写制御配列は、特定の配列に限定されないことが示された。

また、腫瘍細胞のみならず、不死化細胞でも可能であることが示された。

【0158】

[実施例16] E9細胞導入によるマウス空気嚢 (Air pouch) モデルでの阻害作用試験

非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングできるか否かを検討するため、in vitroにおいて、IL4刺激によるSTAT6活性化を介した転写活性を阻害することが知られている化合物2-(6-[3-(4-フルオロフェニル)-1H-4-ピラゾリル]イミダゾ[1,2-a]ピリジン-3-イル)-1,3-チアゾール・3塩酸塩 (国際公開第02/088107号パンフレット) を用いて実験を行った。

【0159】

5% cytodex3 (Amersham Bioscience, 17-0485-01) 溶液および2% CMC溶液 (第一工業製薬株式会社) を調製した。より具体的には、5 gのcytodex3を100 mlのPBS (SIGMA, R8537) で懸濁し、オートクレーブにより滅菌操作を行った。また、2% CMC溶液は、100 mlのPB

Sにスターラーバーで攪拌しながらCMCを2 g加え、その後オートクレーブにより滅菌操作を行い調製した。

次に、E9細胞をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、 1.0×10^6 cells/mlとなるようにDMEM培養液に細胞を懸濁した。 1.0×10^7 cellsのE9細胞に対し0.2 gのcytodex3を混和した。より具体的には、 1.0×10^6 cells/mlの細胞懸濁液10 mlに対し、4 mlの5% cytodex3溶液を混和した。次に、細胞/cytodex3懸濁液をnon-tissue culture plate (IWAKI, SH90-15)に蒔き、CO₂インキュベーターにて培養した。翌日、細胞を回収し、遠心操作を行い、上清を除いた。 2.0×10^6 cells/mlとなるようにDMEM培養液を加え、さらに等量の2% CMC溶液を加え、細胞濃度が 1.0×10^6 cells/ml、CMCの最終濃度が1%となるように細胞を調製した。

【0160】

ジエチルエーテル (WAKO, 055-01155) 麻酔下にて、CDF1マウス (日本チャールズリバー) に27G針付き5mlのテルモシリンジでマウスの背部皮下に3 ml空気をいれ、空気嚢を作成した。次に、細胞懸濁液2 mlを22G針付きシリンジにて空気嚢内に移入した。具体的には、マウス一匹あたり 2.0×10^6 cellsの細胞を移入した。

次に、2-(6-[3-(4-フルオロフェニル)]-1H-4-ピラゾリル]イミダゾ[1,2-a]ピリジン-3-イル)-1,3-チアゾール・3塩酸塩 (国際公開第02/088107号パンフレットに記載された製造方法に準じて製造) を0.5%メチルセルロース (和光純薬工業) 水溶液にメノウ鉢を用いて懸濁した。この被検化合物溶液を、20 mg/kgで経口投与した。一方、対照群には0.5%メチルセルロース水溶液を投与した。

投与1時間後に1% CMCで3 ng/mlとなるように調製したヒトIL4 (カルピオケム、407635) 1 mlを22G針付きシリンジにてマウスの空気嚢内に移入し、よく混和した。

24時間後、ヘパリン処理済みのテルモヘマトクリット毛細管 (TERUMO, VC-H075H) を用いて眼窩採血を行った。採血した血液は、遠心機にて3,000回転、10分間遠心分離を行い、血漿画分を得た。内在性のアルカリフォスファターゼを失活させるために、血漿サンプルを65℃の湯浴中で10分間処理し、血漿中のE9細胞由来のPLAP活性を測定した。より具体的には、ELISA用ブラックプレート (住友ベークライト株式会社、品番MS-8496K) にPLAP buffer (0.28 M Na₂CO₃-NaHCO₃ pH 10.0, 8 mM MgSO₄) を40 μl添加し、血漿サンプル10 μlを添加した。ここにLumi-Phos 530 (Lumigen, Inc.) 50 μlを添加して、混和した。続いて、遮光して、室温で1時間インキュベートした後に、プレートリーダー (Perkin Elmer, ARV0) を用いて化学発光強度を測定した。その結果、被検化合物は、対象群と比較してIL4刺激により活性化されたPLAP活性を94.1%抑制した (図20)。

【0161】

したがって、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物モデルに移植し、当該非ヒト動物モデルにおける分泌タンパク質量を測定することにより、非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングできることが明らかになった。

【0162】

【実施例17】SV40-PLAPレポータープラスミドの作製

PLAP basicベクタープラスミドのKpn I / Hind IIIサイトにSV40プロモーターからなるポリヌクレオチドを挿入し、SV40-PLAPレポータープラスミドを得た。より具体的には、まず、pSEAP controlレポータープラスミド (Clontech) をBgl IIおよびMlu Iで切断した後に、当該切断末端をランティング反応 (タカラバイオ株式会社、Cat.6025) により平滑化した。次に、当該プラスミドをリガーゼ反応によりセルフライゲーションした。定法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems) により配列を確認した。次に、当該プラスミドをKpn IおよびHind IIIで切断し、SV40プロモーター断片を得た。当該SV40プロモーター断片を、あらかじめKpn IおよびHind IIIで切断したPLAP basicベクタープラスミドにリガーゼ反応により挿入した。定法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプ

ラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems)により配列を確認し、SV40-PLAPレポータープラスミド(図21)を得た。

【0163】

【実施例18】SV40-PLAPレポータープラスミド安定導入細胞の作製

実施例12で得たSV40-PLAPレポータープラスミドをEffectone Reagent (QIAGEN, Cat. No. 301427)を用いて、ヒト胃癌細胞株MKN-45細胞に導入し、安定導入細胞をクローニングした。より具体的には、RPMI培養液で継代培養したMKN-45細胞(JCRB細胞バンク、JCRB 0254)を回収し、RPMI培養液を用いて 10×10^4 cells/mlになるように懸濁した。次に、当該細胞懸濁液を2 ml/wellずつ6 well細胞培養用プレート(Becton Dickinson Labware, 35-3046)に蒔き、CO₂インキュベーターにて培養した。翌日、SV40-PLAPレポータープラスミド2 μ gにEC buffer 200 μ lおよびEnhancer 16 μ lを加え、室温にて5分間インキュベートした後、当該DNA溶液にEffectone Reagent 20 μ lを加え、さらに、室温にて5分間インキュベートした。当該DNA溶液にRPMI培養液 964 μ lを加えて混和し、964 μ l/wellずつ細胞の培養上清に添加し、CO₂インキュベーターにて培養した。翌日、当該細胞の培養上清を吸引除去して、新鮮なRPMI培養液2 mlを添加した。翌日、当該細胞をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、600 μ g/mlのG-418(Geneticin: Invitrogen)を含むRPMI培養液を用いて懸濁して、15 cm細胞培養用シャーレ(Becton Dickinson Labware, 35-3025)に蒔き、CO₂インキュベーターにて培養を継続した。600 μ g/mlのG-418を含むRPMI培養液は4日毎に交換した。G-418を添加して培養してから14日目に、当該細胞をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、定法に従い限界希釈法にてクローン化し、MKN-45/SV40-PLAP(M1)を得た。

【0164】

【実施例19】In vivoにおけるSV40-PLAPレポータープラスミド導入細胞の転写活性測定(皮下移植)

600 μ g/mlのG-418を含むRPMI培養液で継代培養したMKN-45/SV40-PLAP(M1)(実施例13)をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、 5×10^7 cells/mlになるようにRPMI培養液にて懸濁した。100 μ lの細胞懸濁液(5×10^6 cells/mouse)をBALB/cヌードマウス(雌性、8週齢、日本チャールズリバーより購入)の皮下に、ツベルクリン用1 ml注射筒(26G針付)を用いて移植した。移植日を含め連日、ヘパリンコート・ヘマトクリット管(ドラモンド社製)を用いて眼窩採血を行った。ヘマトクリット管は専用パテ(テルモ社製)にて片端を閉じた。採血した血液は、ヘマトクリット管用遠心機にて10,000 rpm、2分間の遠心処理を行い、血漿画分を分離した。血漿は、生理食塩水で10倍に希釈して10倍希釈血漿とし、PLAP活性測定まで-20℃にて凍結保存した。MKN-45/SV40-PLAP(M1)からなる腫瘍体積の測定と血漿中PLAP活性の測定は実施例4に示した方法で行った。

【0165】

その結果、血中PLAP活性は、MKN-45/SV40-PLAP(M1)移植前には1000 units以下だったが、腫瘍体積の増加に伴って上昇した(図22)。血中PLAP活性の経時変化は、腫瘍体積の経時変化とほぼ並行していた。従って、非ヒト動物モデルにおいて、血中PLAP活性を測定することにより、腫瘍細胞数を推定することが可能であることが明らかになった。

【0166】

以上の結果から、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、非ヒト動物モデルにおける当該分泌タンパク質量を指標として、移植細胞数または腫瘍体積を測定できることが明らかになった。

【産業上の利用可能性】

【0167】

本発明により、非ヒト動物モデルに移植した培養細胞における転写制御配列の転写活性の簡便かつ精度のよい評価方法を確立し、定量的な評価を可能とした。

これにより、これまでの煩雑かつ定量性の低い評価方法では困難だった転写活性の経時的な変化を測定することが可能となった。

【0168】

また、本発明により、非ヒト動物モデルにおいて、当該転写制御配列の転写活性に影響を与える化合物を非侵襲的かつ簡便にスクリーニングすることが可能となった。

【0169】

さらに、当該転写制御配列として恒常的転写制御配列を用いて、分泌型タンパク質発現ベクターを導入した培養細胞を非ヒト動物モデルに移植して、当該非ヒト動物モデルの血中のタンパク質量を測定することにより、移植細胞数または腫瘍体積の測定および移植細胞数または腫瘍体積に影響を与える化合物を非侵襲的かつ簡便にスクリーニングすることが可能となった。

これにより、これまでの評価方法では困難だった、癌細胞同所移植モデルにおける腫瘍体積の経時的変化を評価することが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【0170】

【図1】図1は、PLAP basicベクタープラスミドの構造を示す。

【図2】図2は、HRE-PLAPレポータープラスミドの構造を示す。

【図3】図3は、HRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞のPLAP活性の解析結果を示す。

【図4】図4は、HRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞をヌードマウスに皮下移植した実験の結果を示す。図中黒丸は血中PLAP活性、白三角は腫瘍体積を示す。横軸は移植後の日数を示す。

【図5】図5は、dsRNA発現ベクタープラスミドの構造を示す。

【図6】図6は、HIF-1 α dsRNA発現ベクタープラスミドの構造を示す。

【図7】図7は、HIF-1 α dsRNA発現プラスミド安定導入細胞のPLAP活性の解析結果を示す。PLAP産生の低酸素誘導率は、低酸素濃度（2%）培養での培地中PLAP活性値を通常酸素濃度（21%）培養での培地中PLAP活性値で除して求めた。

【図8】図8は、HIF-1 α dsRNA発現プラスミド安定導入細胞のHIF-1 α mRNA量の解析結果を示す。

【図9】図9は、HIF-1 α dsRNA発現プラスミド安定導入細胞クローン2D4およびコントロールクローンMD2をヌードマウスに皮下移植した実験の結果を示す。図中丸印は血中PLAP活性、三角印は腫瘍体積を示し、それぞれ黒印はクローンMD2、白印はクローン2D4を示す。横軸は移植後の日数を示す。

【図10】図10は、HRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞を皮下移植したヌードマウスに、抗VEGF抗体を投与した実験の結果を示す。図中丸印は血中PLAP活性、三角印は腫瘍体積を示し、それぞれ黒印は抗VEGF抗体投与群、白印はコントロール群を示す。横軸は治療開始後の日数を示す。

【図11】図11は、HRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞をヌードマウスに腹腔内移植した実験の結果を示す。図中の各系列は各個体の血中PLAP活性を示す。横軸は移植後の日数を示す。

【図12】図12は、VEGF-PLAPレポータープラスミドの構造を示す。

【図13】図13は、VEGF-PLAPレポータープラスミド導入細胞をヌードマウスに頭蓋内移植した実験の結果を示す。図中の各系列は各個体の血中PLAP活性を示す。横軸は移植後の日数を示す。

【図14】図14は、pCREBP2x2-tkPLAPベクターの構造を示す。

【図15】図15は、pCRBP2x2-TK promoter-PLAP basicベクターの構造を示す。

【図16】図16は、STAT6-PLAPレポータープラスミドの構造を示す。

【図17】図17は、STAT6発現ベクタープラスミドの構造を示す。

【図18】図18は、STAT6-PLAPレポータープラスミド、STAT6発現ベクタープラスミドを導入し、安定発現細胞のヒトIL4非刺激又は刺激24時間後のPLAP活性の解析結果を示す。

【図19】図19は、STAT6-PLAPレポータープラスミド、STAT6発現ベクタープラスミド安定発現細胞をマウスの背部空気嚢内に移植し、ヒトIL4非刺激又は刺激24時間

後の血中PLAP活性の解析結果を示す。

【図 2 0】図 2 0 は、STAT6-PLAPレポータープラスミド、STAT6発現ベクタープラスミド安定発現細胞をマウスの背部空気嚢内に移植し、ヒト IL4刺激24時間後における被検化合物投与群と対象群の血中PLAP活性の解析結果を示す。

【図 2 1】図 2 1 は、SV40-PLAPレポータープラスミドの構造を示す。

【図 2 2】図 2 2 は、SV40-PLAPレポータープラスミド導入細胞をヌードマウスに皮下移植した実験の結果を示す。図中黒丸は血中PLAP活性、白三角は腫瘍体積を示す。横軸は移植後の日数を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> エーザイ株式会社

<120> 非ヒト動物モデルにおける転写活性測定方法およびこれを指標とした細胞数の測定方法

<130> E P 0 4 N O 0 3 0 1

<160> 44

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

catacgtggg ctccaacagg tcct 24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

cctacgtgct gtctcacaca gcct 24

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

cgcacgtggc cccggacacg cagg 24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

cacacgtggg ttcccgcacg tccg 24

<210> 5
<211> 8
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc-feature
<222> (1)..(8)
<223> IL4RE

<400> 5
ttnnnnnaa

8

<210> 6
<211> 9
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc-feature
<222> (1)..(9)
<223> IL4RE

<400> 6
ttnnnnnaa

9

<210> 7
<211> 10
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc-feature
<222> (1)..(10)
<223> IL4RE

<400> 7
ttnnnnnnnaa

10

<210> 8
<211> 10
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
 ttcccaagaa 10

<210> 9
 <211> 197
 <212> DNA
 <213> Simian virus 40

<400> 9
 tgcattctcaa ttagtcagca accatagtc cgcacctaac tccgcccatt ccgcccctaa 60
 ctccgcccag ttccgcccatt tctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatgcag 120
 aggccgaggc cgcctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag 180
 gcctaggcctt ttgcaaa 197

<210> 10
 <211> 1521
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1518)
 <223>

<400> 10
 atg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ggc ctg agg cta cag ctc tcc ctg 48
 Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 ggc atc atc cca gtt gag gag gag aac ccg gac ttc tgg aac cgc gag 96
 Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn Arg Glu
 20 25 30
 gca gcc gag gcc ctg ggt gcc gcc aag aag ctg cag cct gca cag aca 144
 Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala Gln Thr
 35 40 45
 gcc gcc aag aac ctc atc atc ttc ctg ggc gat ggg atg ggg gtg tct 192
 Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser
 50 55 60
 acg gtg aca gct gcc agg atc cta aaa ggg cag aag aag gac aaa ctg 240
 Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp Lys Leu
 65 70 75 80

ggg cct gag ata ccc ctg gcc atg gac cgc ttc cca tat gtg gct ctg	288
Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val Ala Leu	
85 90 95	
tcc aag aca tac aat gta gac aaa cat gtg cca gac agt gga gcc aca	336
Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly Ala Thr	
100 105 110	
gcc acg gcc tac ctg tgc ggg gtc aag ggc aac ttc cag acc att ggc	384
Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr Ile Gly	
115 120 125	
ttg agt gca gcc gcc cgc ttt aac cag tgc aac acg aca cgc ggc aac	432
Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn	
130 135 140	
gag gtc atc tcc gtg atg aat cgg gcc aag aaa gca ggg aag tca gtg	480
Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val	
145 150 155 160	
gga gtg gta acc acc aca cga gtg cag cac gcc tcg cca gcc ggc acc	528
Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Thr	
165 170 175	
tac gcc cac acg gtg aac cgc aac tgg tac tcg gac gcc gac gtg cct	576
Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Val Pro	
180 185 190	
gcc tcg gcc cgc cag gag ggg tgc cag gac atc gct acg cag ctc atc	624
Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln Leu Ile	
195 200 205	
tcc aac atg gac att gac gtg atc cta ggt gga ggc cga aag tac atg	672
Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met	
210 215 220	
ttt ccc atg gga acc cca gac cct gag tac cca gat gac tac agc caa	720
Phe Pro Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr Ser Gln	
225 230 235 240	
ggt ggg acc agg ctg gac ggg aag aat ctg gtg cag gaa tgg ctg gcg	768
Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp Leu Ala	
245 250 255	
aag cgc cag ggt gcc cgg tat gtg tgg aac cgc act gag ctc atg cag	816
Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu Met Gln	
260 265 270	
gct tcc ctg gac ccg tct gtg acc cat ctc atg ggt ctc ttt gag cct	864

Ala	Ser	Leu	Asp	Pro	Ser	Val	Thr	His	Leu	Met	Gly	Leu	Phe	Glu	Pro
		275					280					285			

gga	gac	atg	aaa	tac	gag	atc	cac	cga	gac	tcc	aca	ctg	gac	ccc	tcc
Gly	Asp	Met	Lys	Tyr	Glu	Ile	His	Arg	Asp	Ser	Thr	Leu	Asp	Pro	Ser
	290					295				300					

912

ctg	atg	gag	atg	aca	gag	gct	gcc	ctg	cgc	ctg	ctg	agg	agg	aac	ccc
Leu	Met	Glu	Met	Thr	Glu	Ala	Ala	Leu	Arg	Leu	Leu	Ser	Arg	Asn	Pro
305					310					315					320

960

cgc	ggc	ttc	ttc	ctc	ttc	gtg	gag	ggg	ggg	cgc	atc	gac	cat	ggg	cat
Arg	Gly	Phe	Phe	Leu	Phe	Val	Glu	Gly	Gly	Arg	Ile	Asp	His	Gly	His
				325					330					335	

1008

cat	gaa	agc	agg	gct	tac	cgg	gca	ctg	act	gag	acg	atc	atg	ttc	gac
His	Glu	Ser	Arg	Ala	Tyr	Arg	Ala	Leu	Thr	Glu	Thr	Ile	Met	Phe	Asp
			340					345					350		

1056

gac	gcc	att	gag	agg	gcg	ggc	cag	ctc	acc	agc	gag	gag	gac	acg	ctg
Asp	Ala	Ile	Glu	Arg	Ala	Gly	Gln	Leu	Thr	Ser	Glu	Glu	Asp	Thr	Leu
		355					360					365			

1104

agc	ctc	gtc	act	gcc	gac	cac	tcc	cac	gtc	ttc	tcc	ttc	gga	ggc	tac
Ser	Leu	Val	Thr	Ala	Asp	His	Ser	His	Val	Phe	Ser	Phe	Gly	Gly	Tyr
	370					375					380				

1152

ccc	ctg	cga	ggg	agc	tcc	atc	ttc	ggg	ctg	gcc	cct	ggc	aag	gcc	cgg
Pro	Leu	Arg	Gly	Ser	Ser	Ile	Phe	Gly	Leu	Ala	Pro	Gly	Lys	Ala	Arg
385					390					395					400

1200

gat	cgt	aag	gcc	tac	aca	gtg	cta	ctg	tat	ggc	aat	ggc	cca	ggg	tat
Asp	Arg	Lys	Ala	Tyr	Thr	Val	Leu	Leu	Tyr	Gly	Asn	Gly	Pro	Gly	Tyr
				405					410					415	

1248

gtc	cta	aag	gat	gga	gct	aga	cca	gat	gtc	aca	gag	tca	gag	tct	gga
Val	Leu	Lys	Asp	Gly	Ala	Arg	Pro	Asp	Val	Thr	Glu	Ser	Glu	Ser	Gly
			420					425					430		

1296

tct	cca	gag	tac	cgt	cag	caa	tcg	gcc	gta	ccg	tta	gat	gaa	gag	act
Ser	Pro	Glu	Tyr	Arg	Gln	Gln	Ser	Ala	Val	Pro	Leu	Asp	Glu	Glu	Thr
		435					440					445			

1344

cac	gca	ggg	gaa	gac	gtc	gct	gtc	ttt	gca	aga	ggg	ccc	cag	gca	cat
His	Ala	Gly	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Phe	Ala	Arg	Gly	Pro	Gln	Ala	His
	450					455					460				

1392

ctc	gtg	cat	ggc	gta	cag	gaa	cag	act	ttc	atc	gct	cat	gta	atg	gca
Leu	Val	His	Gly	Val	Gln	Glu	Gln	Thr	Phe	Ile	Ala	His	Val	Met	Ala
465					470					475					480

1440

ttc	gca	gca	tgt	ttg	gag	cca	tat	acc	gct	tgc	gat	tta	gct	cca	cca	1488
Phe	Ala	Ala	Cys	Leu	Glu	Pro	Tyr	Thr	Ala	Cys	Asp	Leu	Ala	Pro	Pro	
			485						490					495		

gca	ggg	acg	aca	gac	gct	gcc	cat	cca	ggg	taa	1521
Ala	Gly	Thr	Thr	Asp	Ala	Ala	His	Pro	Gly		
			500						505		

<210> 11
 <211> 506
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Met	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu	Gln	Leu	Ser	Leu
1				5					10					15	

Gly	Ile	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asn	Pro	Asp	Phe	Trp	Asn	Arg	Glu
			20					25					30		

Ala	Ala	Glu	Ala	Leu	Gly	Ala	Ala	Lys	Lys	Leu	Gln	Pro	Ala	Gln	Thr
		35					40						45		

Ala	Ala	Lys	Asn	Leu	Ile	Ile	Phe	Leu	Gly	Asp	Gly	Met	Gly	Val	Ser
	50					55					60				

Thr	Val	Thr	Ala	Ala	Arg	Ile	Leu	Lys	Gly	Gln	Lys	Lys	Asp	Lys	Leu
65					70					75					80

Gly	Pro	Glu	Ile	Pro	Leu	Ala	Met	Asp	Arg	Phe	Pro	Tyr	Val	Ala	Leu
				85					90					95	

Ser	Lys	Thr	Tyr	Asn	Val	Asp	Lys	His	Val	Pro	Asp	Ser	Gly	Ala	Thr
			100					105					110		

Ala	Thr	Ala	Tyr	Leu	Cys	Gly	Val	Lys	Gly	Asn	Phe	Gln	Thr	Ile	Gly
		115					120					125			

Leu	Ser	Ala	Ala	Ala	Arg	Phe	Asn	Gln	Cys	Asn	Thr	Thr	Arg	Gly	Asn
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

130

135

140

Glu	Val	Ile	Ser	Val	Met	Asn	Arg	Ala	Lys	Lys	Ala	Gly	Lys	Ser	Val
145					150					155					160

Gly	Val	Val	Thr	Thr	Thr	Arg	Val	Gln	His	Ala	Ser	Pro	Ala	Gly	Thr
				165					170					175	

Tyr	Ala	His	Thr	Val	Asn	Arg	Asn	Trp	Tyr	Ser	Asp	Ala	Asp	Val	Pro
			180					185					190		

Ala	Ser	Ala	Arg	Gln	Glu	Gly	Cys	Gln	Asp	Ile	Ala	Thr	Gln	Leu	Ile
		195					200						205		

Ser	Asn	Met	Asp	Ile	Asp	Val	Ile	Leu	Gly	Gly	Gly	Arg	Lys	Tyr	Met
	210					215					220				

Phe	Pro	Met	Gly	Thr	Pro	Asp	Pro	Glu	Tyr	Pro	Asp	Asp	Tyr	Ser	Gln
225					230					235					240

Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Asp	Gly	Lys	Asn	Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Leu	Ala
				245					250					255	

Lys	Arg	Gln	Gly	Ala	Arg	Tyr	Val	Trp	Asn	Arg	Thr	Glu	Leu	Met	Gln
		260						265					270		

Ala	Ser	Leu	Asp	Pro	Ser	Val	Thr	His	Leu	Met	Gly	Leu	Phe	Glu	Pro
		275					280					285			

Gly	Asp	Met	Lys	Tyr	Glu	Ile	His	Arg	Asp	Ser	Thr	Leu	Asp	Pro	Ser
	290					295					300				

Leu	Met	Glu	Met	Thr	Glu	Ala	Ala	Leu	Arg	Leu	Leu	Ser	Arg	Asn	Pro
305					310					315					320

Arg	Gly	Phe	Phe	Leu	Phe	Val	Glu	Gly	Gly	Arg	Ile	Asp	His	Gly	His
				325					330					335	

His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met Phe Asp
340 345 350

Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp Thr Leu
355 360 365

Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr
370 375 380

Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Arg
385 390 395 400

Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr
405 410 415

Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu Ser Gly
420 425 430

Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu Glu Thr
435 440 445

His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His
450 455 460

Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val Met Ala
465 470 475 480

Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala Pro Pro
485 490 495

Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly
500 505

<210> 12

<211> 1521

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1518)
<223>

<400> 12

atg	ctg	ctg	ctg	ctg	ctg	ctg	ctg	ctg	ggc	ctg	agg	cta	cag	ctc	tcc	ctg	48
Met	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu	Gln	Leu	Ser	Leu	
1				5					10						15		

ggc	atc	atc	cca	gtt	gag	gag	gag	aac	ccg	gac	ttc	tgg	aac	cgc	gag	96
Gly	Ile	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asn	Pro	Asp	Phe	Trp	Asn	Arg	Glu	
			20					25					30			

gca	gcc	gag	gcc	ctg	ggt	gcc	gcc	aag	aag	ctg	cag	cct	gca	cag	aca	144
Ala	Ala	Glu	Ala	Leu	Gly	Ala	Ala	Lys	Lys	Leu	Gln	Pro	Ala	Gln	Thr	
		35					40						45			

gcc	gcc	aag	aac	ctc	atc	atc	ttc	ctg	ggc	gat	ggg	atg	ggg	gtg	tct	192
Ala	Ala	Lys	Asn	Leu	Ile	Ile	Phe	Leu	Gly	Asp	Gly	Met	Gly	Val	Ser	
	50					55					60					

acg	gtg	aca	gct	gcc	agg	atc	cta	aaa	ggg	cag	aag	aag	gac	aaa	ctg	240
Thr	Val	Thr	Ala	Ala	Arg	Ile	Leu	Lys	Gly	Gln	Lys	Lys	Asp	Lys	Leu	
65					70					75					80	

ggg	cct	gag	ata	ccc	ctg	gcc	atg	gac	cgc	ttc	cca	tat	gtg	gct	ctg	288
Gly	Pro	Glu	Ile	Pro	Leu	Ala	Met	Asp	Arg	Phe	Pro	Tyr	Val	Ala	Leu	
			85						90					95		

tcc	aag	aca	tac	aat	gta	gac	aaa	cat	gtg	cca	gac	agt	gga	gcc	aca	336
Ser	Lys	Thr	Tyr	Asn	Val	Asp	Lys	His	Val	Pro	Asp	Ser	Gly	Ala	Thr	
			100					105					110			

gcc	acg	gcc	tac	ctg	tgc	ggg	gtc	aag	ggc	aac	ttc	cag	acc	att	ggc	384
Ala	Thr	Ala	Tyr	Leu	Cys	Gly	Val	Lys	Gly	Asn	Phe	Gln	Thr	Ile	Gly	
		115					120					125				

ttg	agt	gca	gcc	gcc	cgc	ttt	aac	cag	tgc	aac	acg	aca	cgc	ggc	aac	432
Leu	Ser	Ala	Ala	Ala	Arg	Phe	Asn	Gln	Cys	Asn	Thr	Thr	Arg	Gly	Asn	
	130					135					140					

gag	gtc	atc	tcc	gtg	atg	aat	cgg	gcc	aag	aaa	gca	ggg	aag	tca	gtg	480
Glu	Val	Ile	Ser	Val	Met	Asn	Arg	Ala	Lys	Lys	Ala	Gly	Lys	Ser	Val	
145					150					155					160	

gga	gtg	gta	acc	acc	aca	cga	gtg	cag	cac	gcc	tcg	cca	gcc	ggc	acc	528
Gly	Val	Val	Thr	Thr	Thr	Arg	Val	Gln	His	Ala	Ser	Pro	Ala	Gly	Thr	
				165					170					175		

tac gcc cac acg gtg aac cgc aac tgg tac tcg gac gcc gac gtg cct	576
Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Val Pro	
180 185 190	
gcc tcg gcc cgc cag gag ggg tgc cag gac atc gct acg cag ctc atc	624
Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln Leu Ile	
195 200 205	
tcc aac atg gac att gac gtg atc cta ggt gga ggc cga aag tac atg	672
Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met	
210 215 220	
ttt cgc atg gga acc cca gac cct gag tac cca gat gac tac agc caa	720
Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr Ser Gln	
225 230 235 240	
ggt ggg acc agg ctg gac ggg aag aat ctg gtg cag gaa tgg ctg gcg	768
Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp Leu Ala	
245 250 255	
aag cgc cag ggt gcc cgg tat gtg tgg aac cgc act gag ctc atg cag	816
Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu Met Gln	
260 265 270	
gct tcc ctg gac ccg tct gtg acc cat ctc atg ggt ctc ttt gag cct	864
Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro	
275 280 285	
gga gac atg aaa tac gag atc cac cga gac tcc aca ctg gac ccc tcc	912
Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp Pro Ser	
290 295 300	
ctg atg gag atg aca gag gct gcc ctg cgc ctg ctg agc agg aac ccc	960
Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu Leu Ser Arg Asn Pro	
305 310 315 320	
cgc ggc ttc ttc ctc ttc gtg gag ggt ggt cgc atc gac cat ggt cat	1008
Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His	
325 330 335	
cat gaa agc agg gct tac cgg gca ctg act gag acg atc atg ttc gac	1056
His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met Phe Asp	
340 345 350	
gac gcc att gag agg gcg ggc cag ctc acc agc gag gag gac acg ctg	1104
Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp Thr Leu	
355 360 365	
agc ctc gtc act gcc gac cac tcc cac gtc ttc tcc ttc gga ggc tac	1152
Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr	

370	375	380	
ccc ctg cga ggg agc tcc atc ttc ggg ctg gcc cct ggc aag gcc cgg			1200
Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Arg			
385	390	395	400

gac agg aag gcc tac acg gtc ctc cta tac gga aac ggt cca ggc tat			1248
Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr			
	405	410	415

gtg ctc aag gac ggc gcc cgg ccg gat gtt acc gag agc gag agc ggg			1296
Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu Ser Gly			
	420	425	430

agc ccc gag tat cgg cag cag tca gca gtg ccc ctg gac gaa gag acc			1344
Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu Glu Thr			
	435	440	445

cac gca ggc gag gac gtg gcg gtg ttc gcg cgc ggc ccg cag gcg cac			1392
His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His			
	450	455	460

ctg gtt cac ggc gtg cag gag cag acc ttc ata gcg cac gtc atg gcc			1440
Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val Met Ala			
465	470	475	480

ttc gcc gcc tgc ctg gag ccc tac acc gcc tgc gac ctg gcg ccc ccc			1488
Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala Pro Pro			
	485	490	495

gcc ggc acc acc gac gcc gcg cac ccg ggt taa			1521
Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly			
	500	505	

<210> 13
 <211> 506
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser Leu
1 5 10 15

Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn Arg Glu
20 25 30

Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala Gln Thr
35 40 45

Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser
50 55 60

Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp Lys Leu
65 70 75 80

Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val Ala Leu
85 90 95

Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly Ala Thr
100 105 110

Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr Ile Gly
115 120 125

Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn
130 135 140

Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val
145 150 155 160

Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Thr
165 170 175

Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Val Pro
180 185 190

Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln Leu Ile
195 200 205

Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met
210 215 220

Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr Ser Gln
225 230 235 240

Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Asp	Gly	Lys	Asn	Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Leu	Ala	
				245					250					255		
Lys	Arg	Gln	Gly	Ala	Arg	Tyr	Val	Trp	Asn	Arg	Thr	Glu	Leu	Met	Gln	
			260					265					270			
Ala	Ser	Leu	Asp	Pro	Ser	Val	Thr	His	Leu	Met	Gly	Leu	Phe	Glu	Pro	
		275					280					285				
Gly	Asp	Met	Lys	Tyr	Glu	Ile	His	Arg	Asp	Ser	Thr	Leu	Asp	Pro	Ser	
	290					295					300					
Leu	Met	Glu	Met	Thr	Glu	Ala	Ala	Leu	Arg	Leu	Leu	Ser	Arg	Asn	Pro	
305					310					315					320	
Arg	Gly	Phe	Phe	Leu	Phe	Val	Glu	Gly	Gly	Arg	Ile	Asp	His	Gly	His	
				325					330					335		
His	Glu	Ser	Arg	Ala	Tyr	Arg	Ala	Leu	Thr	Glu	Thr	Ile	Met	Phe	Asp	
			340					345					350			
Asp	Ala	Ile	Glu	Arg	Ala	Gly	Gln	Leu	Thr	Ser	Glu	Glu	Asp	Thr	Leu	
		355					360					365				
Ser	Leu	Val	Thr	Ala	Asp	His	Ser	His	Val	Phe	Ser	Phe	Gly	Gly	Tyr	
	370					375					380					
Pro	Leu	Arg	Gly	Ser	Ser	Ile	Phe	Gly	Leu	Ala	Pro	Gly	Lys	Ala	Arg	
385					390					395					400	
Asp	Arg	Lys	Ala	Tyr	Thr	Val	Leu	Leu	Tyr	Gly	Asn	Gly	Pro	Gly	Tyr	
				405					410					415		
Val	Leu	Lys	Asp	Gly	Ala	Arg	Pro	Asp	Val	Thr	Glu	Ser	Glu	Ser	Gly	
			420					425					430			

Ser	Pro	Glu	Tyr	Arg	Gln	Gln	Ser	Ala	Val	Pro	Leu	Asp	Glu	Glu	Thr
		435					440					445			

His	Ala	Gly	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Phe	Ala	Arg	Gly	Pro	Gln	Ala	His
	450					455					460				

Leu	Val	His	Gly	Val	Gln	Glu	Gln	Thr	Phe	Ile	Ala	His	Val	Met	Ala
465					470					475					480

Phe	Ala	Ala	Cys	Leu	Glu	Pro	Tyr	Thr	Ala	Cys	Asp	Leu	Ala	Pro	Pro
				485					490					495	

Ala	Gly	Thr	Thr	Asp	Ala	Ala	His	Pro	Gly
		500						505	

<210> 14
 <211> 1560
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1557)
 <223>

<400> 14																	
atg	ctg	ctg	ctg	ctg	ctg	ctg	ctg	ctg	ggc	ctg	agg	cta	cag	ctc	tcc	ctg	48
Met	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu	Gln	Leu	Ser	Leu	
1				5					10						15		

ggc	atc	atc	cca	gtt	gag	gag	gag	aac	ccg	gac	ttc	tgg	aac	cgc	gag	96
Gly	Ile	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asn	Pro	Asp	Phe	Trp	Asn	Arg	Glu	
			20					25					30			

gca	gcc	gag	gcc	ctg	ggt	gcc	gcc	aag	aag	ctg	cag	cct	gca	cag	aca	144
Ala	Ala	Glu	Ala	Leu	Gly	Ala	Ala	Lys	Lys	Leu	Gln	Pro	Ala	Gln	Thr	
		35					40					45				

gcc	gcc	aag	aac	ctc	atc	atc	ttc	ctg	ggc	gat	ggg	atg	ggg	gtg	tct	192
Ala	Ala	Lys	Asn	Leu	Ile	Ile	Phe	Leu	Gly	Asp	Gly	Met	Gly	Val	Ser	
	50					55				60						

acg	gtg	aca	gct	gcc	agg	atc	cta	aaa	ggg	cag	aag	aag	gac	aaa	ctg	240
Thr	Val	Thr	Ala	Ala	Arg	Ile	Leu	Lys	Gly	Gln	Lys	Lys	Asp	Lys	Leu	
65					70				75						80	

ggg cct gag ata ccc ctg gcc atg gac cgc ttc cca tat gtg gct ctg	288
Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val Ala Leu	
85 90 95	
tcc aag aca tac aat gta gac aaa cat gtg cca gac agt gga gcc aca	336
Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly Ala Thr	
100 105 110	
gcc acg gcc tac ctg tgc ggg gtc aag ggc aac ttc cag acc att ggc	384
Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr Ile Gly	
115 120 125	
ttg agt gca gcc gcc cgc ttt aac cag tgc aac acg aca cgc ggc aac	432
Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn	
130 135 140	
gag gtc atc tcc gtg atg aat cgg gcc aag aaa gca ggg aag tca gtg	480
Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val	
145 150 155 160	
gga gtg gta acc acc aca cga gtg cag cac gcc tcg cca gcc ggc acc	528
Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Thr	
165 170 175	
tac gcc cac acg gtg aac cgc aac tgg tac tcg gac gcc gac gtg cct	576
Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Val Pro	
180 185 190	
gcc tcg gcc cgc cag gag ggg tgc cag gac atc gct acg cag ctc atc	624
Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln Leu Ile	
195 200 205	
tcc aac atg gac att gac gtg atc cta ggt gga ggc cga aag tac atg	672
Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met	
210 215 220	
ttt cgc atg gga acc cca gac cct gag tac cca gat gac tac agc caa	720
Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr Ser Gln	
225 230 235 240	
ggt ggg acc agg ctg gac ggg aag aat ctg gtg cag gaa tgg ctg gcg	768
Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp Leu Ala	
245 250 255	
aag cgc cag ggt gcc cgg tat gtg tgg aac cgc act gag ctc atg cag	816
Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu Met Gln	
260 265 270	
gct tcc ctg gac ccg tct gtg acc cat ctc atg ggt ctc ttt gag cct	864
Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro	

275	280	285	
gga gac atg aaa tac gag atc cac cga gac tcc	aca ctg gac ccc tcc	912	
Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser	Thr Leu Asp Pro Ser		
290	295	300	
ctg atg gag atg aca gag gct gcc ctg cgc ctg ctg agc agg aac ccc	960		
Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu Leu Ser Arg Asn Pro			
305	310	315	320
cgc ggc ttc ttc ctc ttc gtg gag ggt ggt cgc atc gac cat ggt cat	1008		
Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His			
325	330	335	
cat gaa agc agg gct tac cgg gca ctg act gag acg atc atg ttc gac	1056		
His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met Phe Asp			
340	345	350	
gac gcc att gag agg gcg ggc cag ctc acc agc gag gag gac acg ctg	1104		
Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp Thr Leu			
355	360	365	
agc ctc gtc act gcc gac cac tcc cac gtc ttc tcc ttc gga ggc tac	1152		
Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr			
370	375	380	
ccc ctg cga ggg agc tcc atc ttc ggg ctg gcc cct ggc aag gcc cgg	1200		
Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Arg			
385	390	395	400
gac agg aag gcc tac acg gtc ctc cta tac gga aac ggt cca ggc tat	1248		
Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr			
405	410	415	
gtg ctc aag gac ggc gcc cgg ccg gat gtt acc gag agc gag agc ggg	1296		
Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu Ser Gly			
420	425	430	
agc ccc gag tat cgg cag cag tca gca gtg ccc ctg gac gaa gag acc	1344		
Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu Glu Thr			
435	440	445	
cac gca ggc gag gac gtg gcg gtg ttc gcg cgc ggc ccg cag gcg cac	1392		
His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His			
450	455	460	
ctg gtt cac ggc gtg cag gag cag acc ttc ata gcg cac gtc atg gcc	1440		
Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val Met Ala			
465	470	475	480

ttc gcc gcc tgc ctg gag ccc tac acc gcc tgc gac ctg gcg ccc ccc	1488
Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala Pro Pro	
485 490 495	

gcc ggc acc acc gac gcc gcg cac ccg ggt tac tct aga gtc ggg gcg	1536
Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly Tyr Ser Arg Val Gly Ala	
500 505 510	

gcc ggc cgc ttc gag cag aca tga	1560
Ala Gly Arg Phe Glu Gln Thr	
515	

<210> 15
 <211> 519
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser Leu
1 5 10 15

Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn Arg Glu
20 25 30

Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala Gln Thr
35 40 45

Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser
50 55 60

Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp Lys Leu
65 70 75 80

Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val Ala Leu
85 90 95

Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly Ala Thr
100 105 110

Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr Ile Gly
115 120 125

Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His
325 330 335

His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met Phe Asp
340 345 350

Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp Thr Leu
355 360 365

Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr
370 375 380

Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Arg
385 390 395 400

Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr
405 410 415

Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu Ser Gly
420 425 430

Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu Glu Thr
435 440 445

His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His
450 455 460

Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val Met Ala
465 470 475 480

Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala Pro Pro
485 490 495

Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly Tyr Ser Arg Val Gly Ala
500 505 510

Ala Gly Arg Phe Glu Gln Thr
515

<210> 16
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 16
ccagaattcc tgcctcgcca ctgtcc

26

<210> 17
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 17
ttaggattcct ggcagctgtc ac

22

<210> 18
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 18
gtgacagctg ccaggattcct aa

22

<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 19
aggaccgtgt aggcctccct gt

22

<210> 20

<211> 98
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo DNA

<400> 20
aagcccgga tcgtaaggcc tacacagtgc tactgtatgg caatggccca gggatatgtcc 60

taaaggatgg agctagacca gatgtcacag agtcagag 98

<210> 21
<211> 98
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo DNA

<400> 21
aaagacagcg acgtcttccc ctgcgtgagt ctcttcatct aacggtagcg ccgattgctg 60

acgggtactct ggagatccag actctgactc tgtgacat 98

<210> 22
<211> 98
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo DNA

<400> 22
ggaagacgtc gctgtctttg caagagggtcc ccaggcacat ctcgtagcatg gcgtacagga 60

acagactttc atcgctcatg taatggcatt cgcagcat 98

<210> 23
<211> 100
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo DNA

<400> 23

tccagatctg ggttaacctg gatgggcagc gtctgtcgta cctgctgggtg gagctaaatc 60

gcaagcggta tatggctcca aacatgctgc gaatgccatt 100

<210> 24

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligo DNA

<400> 24

aattcaagct taccatg 17

<210> 25

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligo DNA

<400> 25

gtaagcttg 9

<210> 26

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligo DNA

<400> 26

cgagctctta cgcgtgctag cccggggctcg aga 33

<210> 27

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligo DNA

<400> 27

agcttctcga gcccgggcta gcacgcgtaa gagctcggta c 41

<210> 28
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo DNA

<400> 28
cacagtgcac acgtgggctc caacagggtcc tcttcgtac 39

<210> 29
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo DNA

<400> 29
gaagaggacc tgttggagcc cacgtatgca ctgtggtac 39

<210> 30
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 30
ggcggtaggc gtgtacgggtg ggagggtc 27

<210> 31
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 31
taccaagctt aagtttaaac gc 22

<210> 32
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 32
acagaattcg aacgctgacg tcatca

26

<210> 33
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 33
gaaagcttgg tagatctgtg gtctcataca gaacttataa gat

43

<210> 34
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo DNA

<400> 34
ctagaggtag cagctgctag cg

22

<210> 35
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo DNA

<400> 35
aattcgctag cagctggtac ct

22

<210> 36

<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 36
g a u a a g u u c u g a a c g u c g a

19

<210> 37
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo DNA

<400> 37
g a t c c c c g a t a a g t t c t g a a c g t c g a t t c a a g a g a t c g a c g t t c a g a a c t t a t c t t t t t g

60

g a a a

64

<210> 38
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo DNA

<400> 38
a g c t t t t c c a a a a g a t a a g t t c t g a a c g t c g a t c t c t t g a a t c g a c g t t c a g a a c t t a t

60

c g g g

64

<210> 39
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo DNA

<400> 39
c t a g t c a g g t c a c a g g t c a c a g g t c a c a g t t c a a t

35

<210> 40
<211> 35

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo DNA

<400> 40
ctagattgaa ctgtgacctg tgacctgtga cctga 35

<210> 41
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo DNA

<400> 41
agcgggtacct cgacttccca agaacagaat cgacttccca agaacagaat cgacttccca 60
agaacagaat ctagagct 78

<210> 42
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo DNA

<400> 42
agctctagat tctgttcttg ggaagtcgat tctgttcttg ggaagtcgat tctgttcttg 60
ggaagtcgag gtaccgct 78

<210> 43
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 43
cggaattcat gtctctgtgg ggtctggtct cca 33

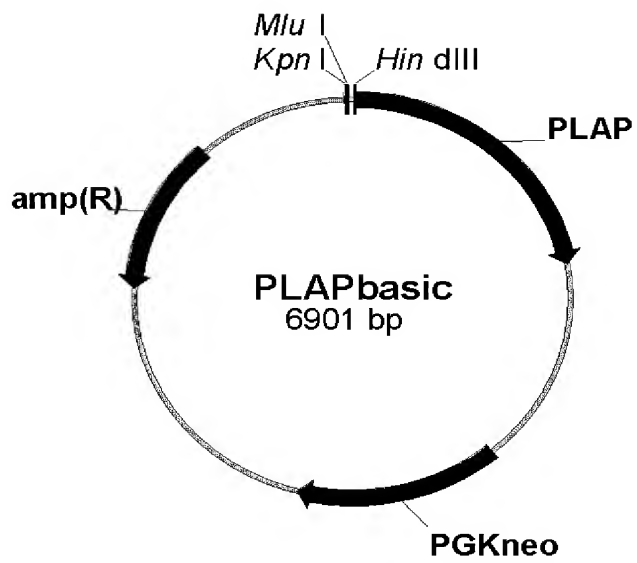
<210> 44
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

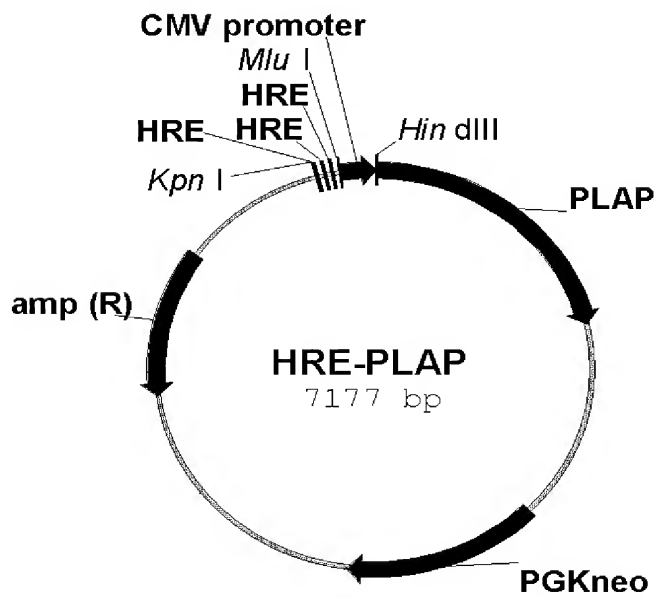
<400> 44
gctctagatc accaactggg gttggccctt agg

【書類名】 図面

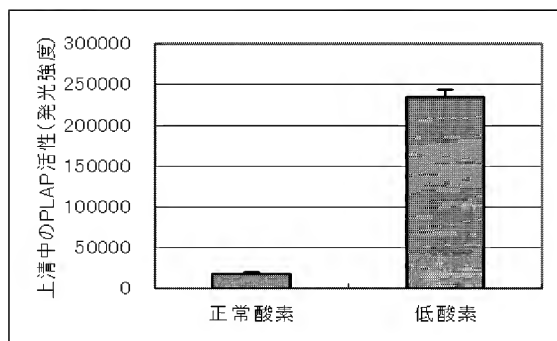
【図 1】



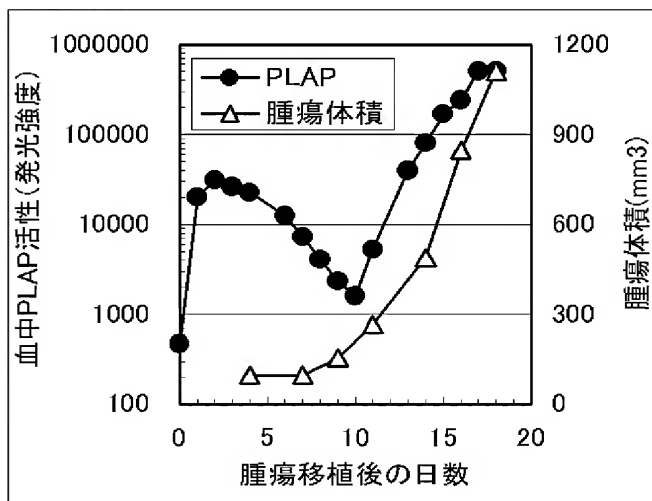
【図 2】



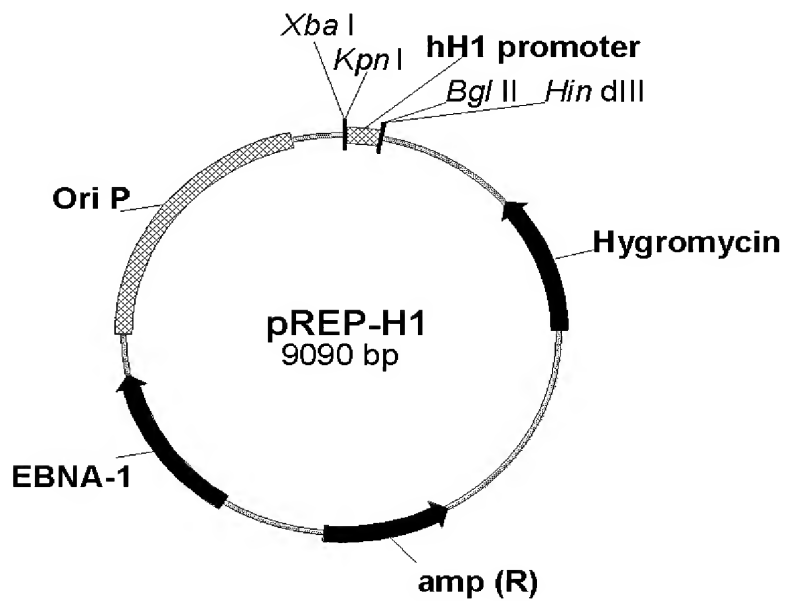
【図 3】



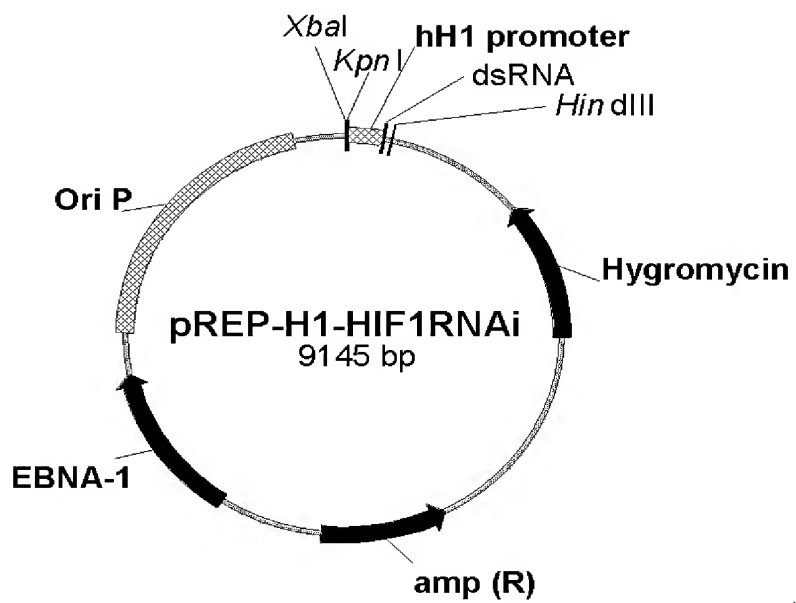
【図 4】



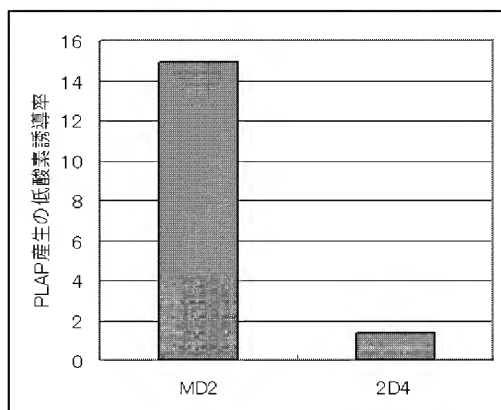
【図 5】



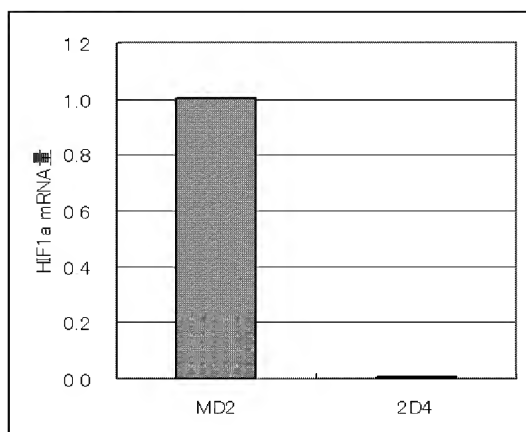
【 図 6 】



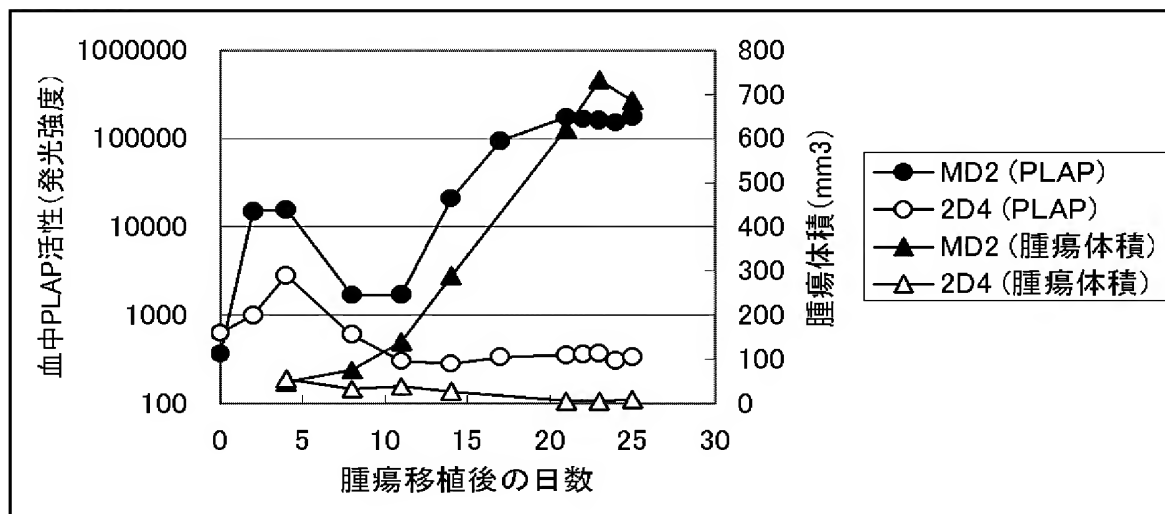
【 図 7 】



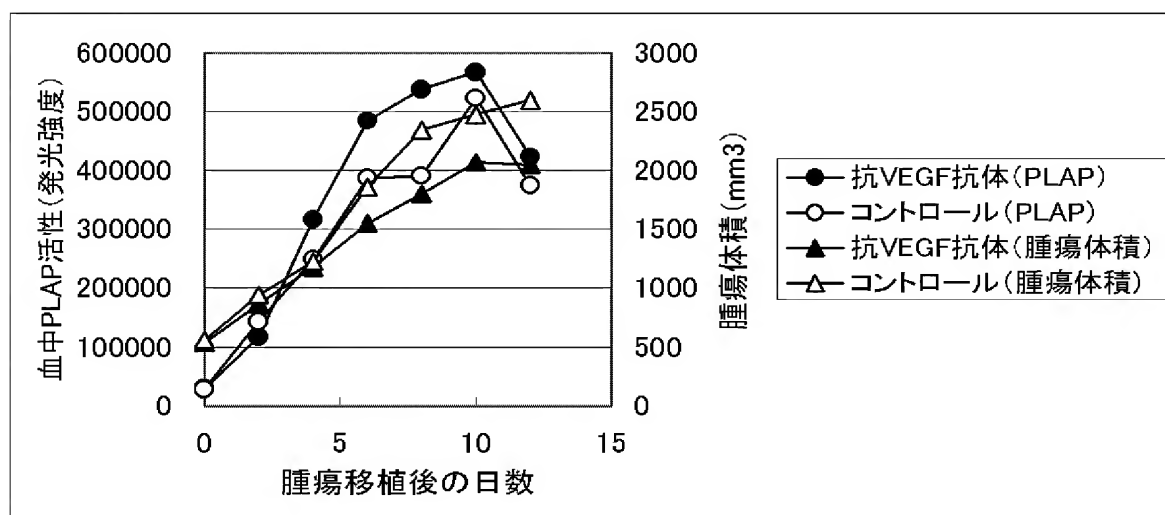
【 図 8 】



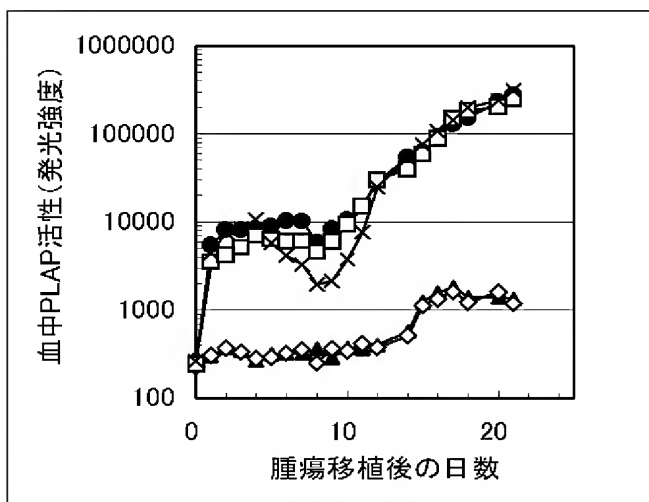
【図 9】



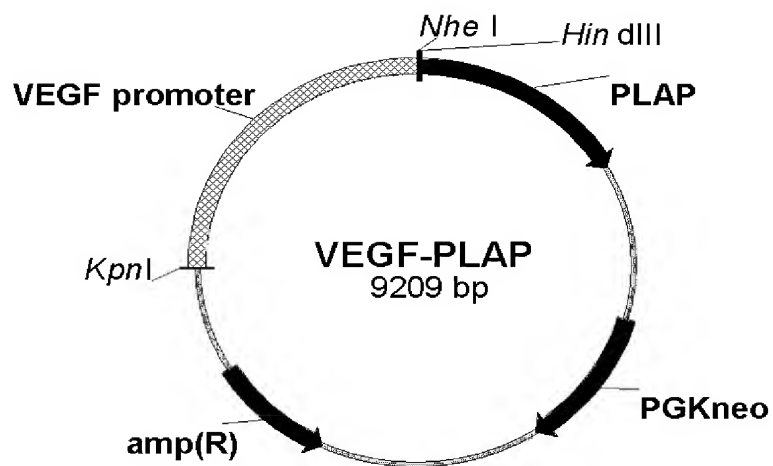
【図 10】



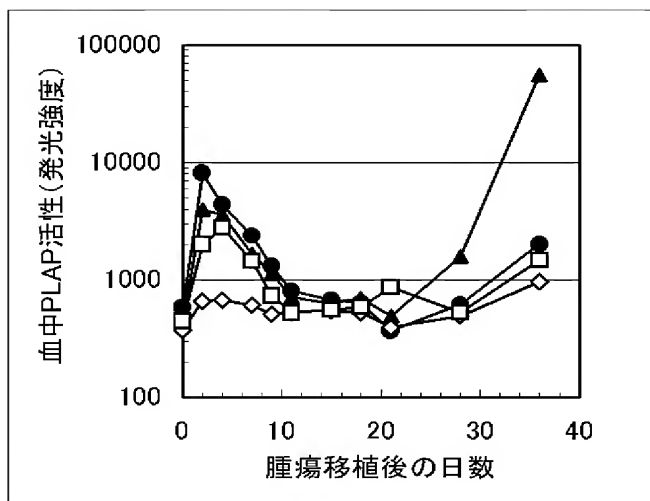
【図 11】



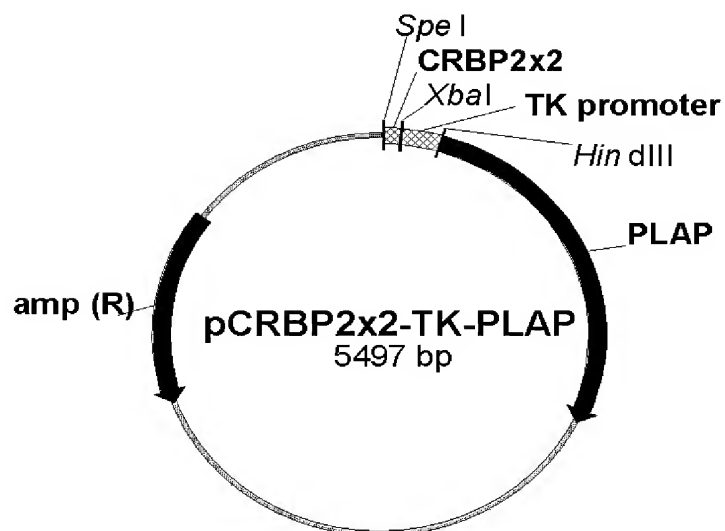
【図 1 2】



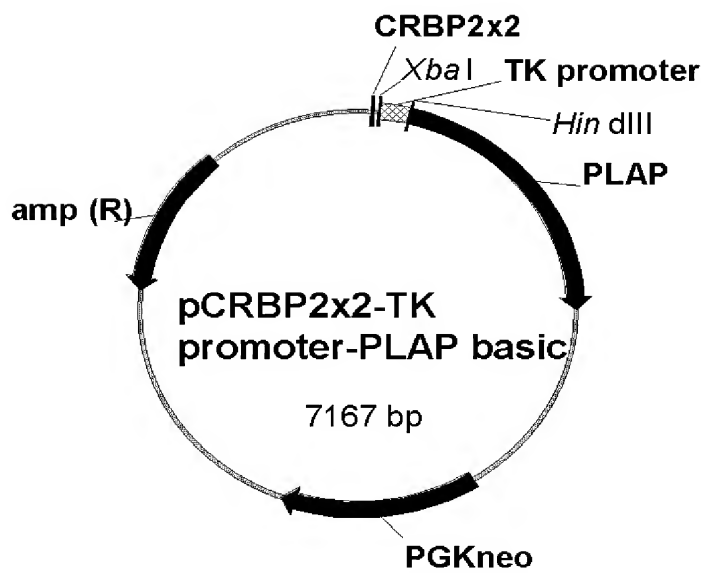
【図 1 3】



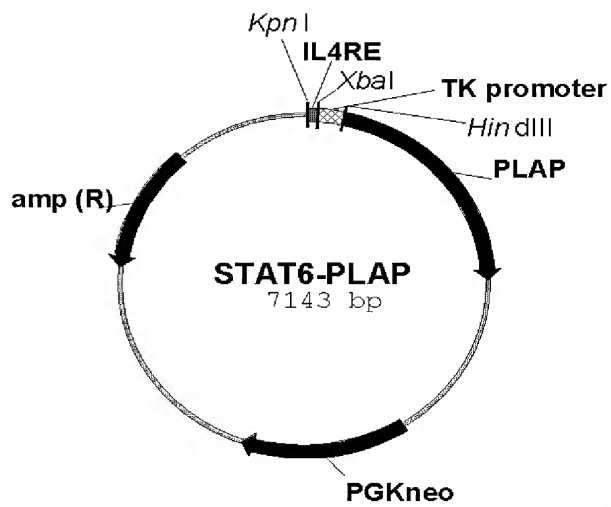
【図 1 4】



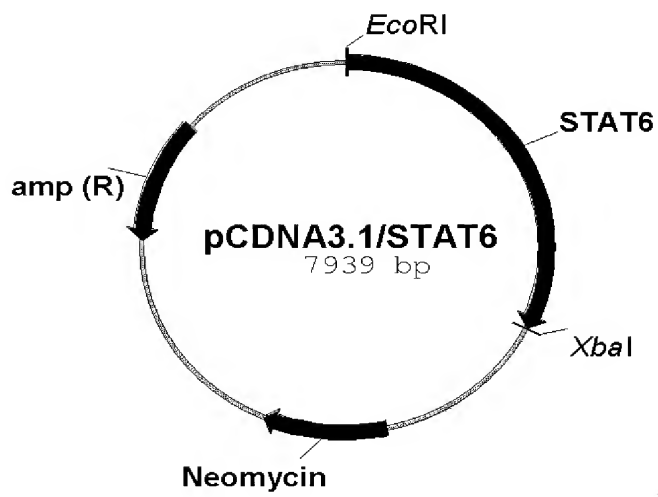
【 図 1 5 】



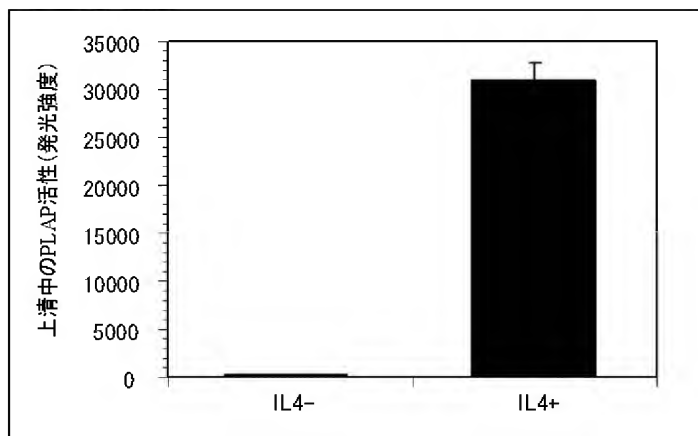
【 図 1 6 】



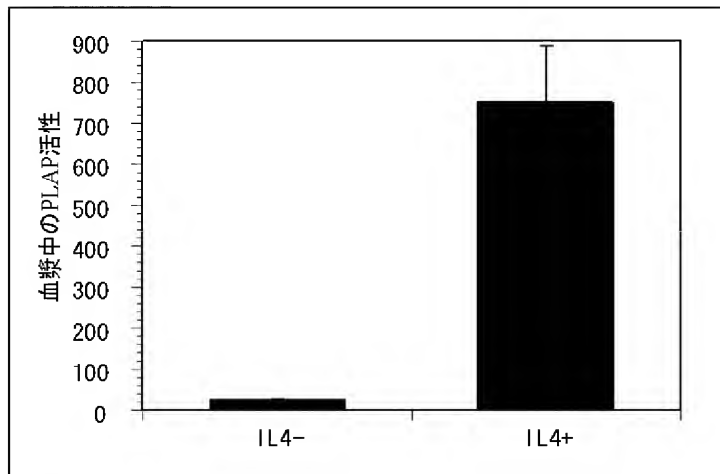
【 図 1 7 】



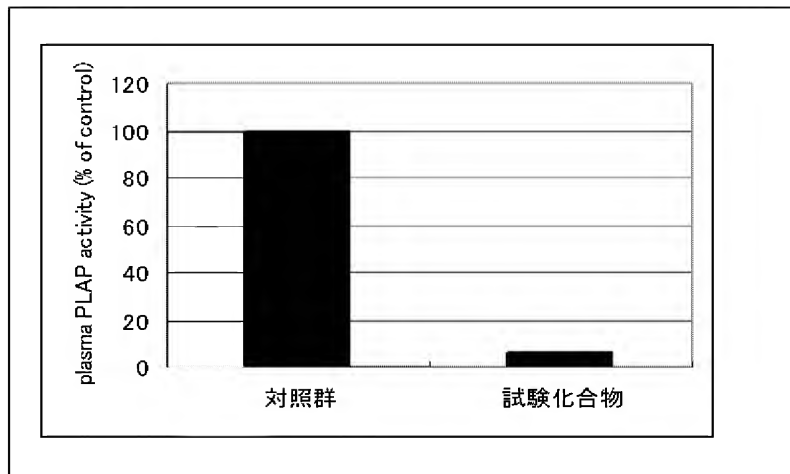
【図 1 8】



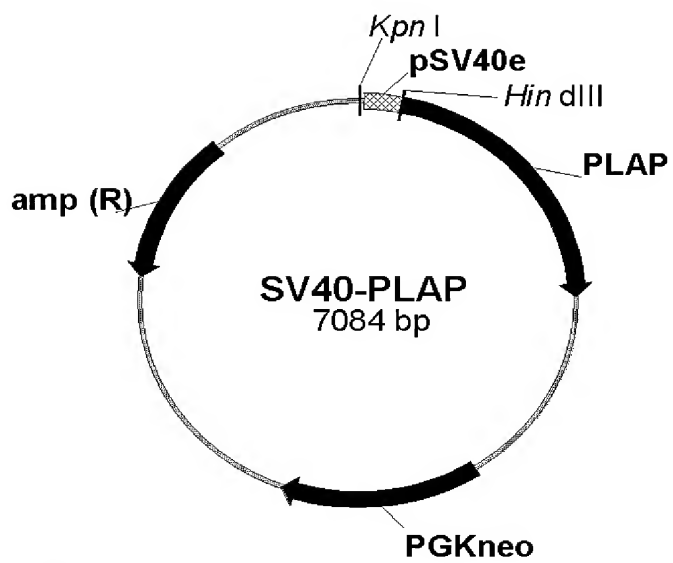
【図 1 9】



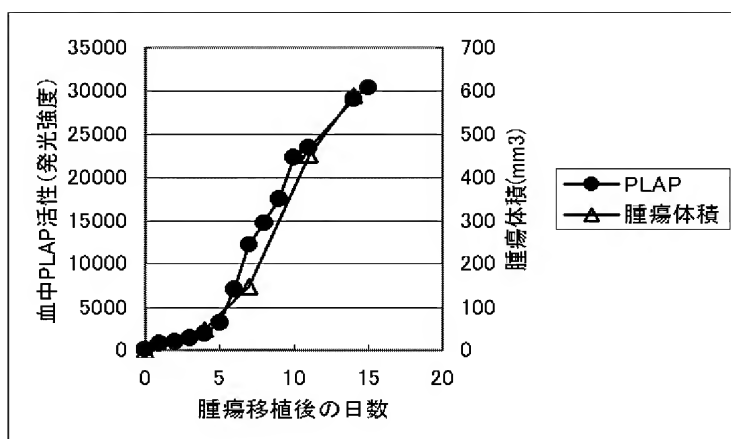
【図 2 0】



【図 2 1】



【図 2 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明の課題は、非ヒト動物モデルに移植した培養細胞における転写制御配列の転写活性の簡便かつ精度のよい評価方法および転写制御配列の転写活性に影響を与える化合物のスクリーニング方法ならびに非ヒト動物モデルに移植した培養細胞の細胞数を測定する方法および細胞数に影響を与える化合物の非侵襲的かつ簡便なスクリーニング方法を確立することにある。

【解決手段】 分泌型に改変した胎盤由来アルカリフォスファターゼ遺伝子の上流に転写制御配列を挿入したベクターを作製し、当該ベクターを導入した培養細胞を非ヒト動物モデルに移植して、当該非ヒト動物モデルの血中の酵素活性を測定することにより、当該転写制御配列の転写活性の測定、当該転写制御配列の転写活性に影響を与える化合物のスクリーニング、移植細胞数の測定および移植細胞数に影響を与える化合物のスクリーニングが可能であることを見出した。

【選択図】 なし

出願人履歴

0 0 0 0 0 0 2 1 7

19900829

新規登録

5 0 0 1 7 4 4 6 5

東京都文京区小石川4丁目6番10号

エーザイ株式会社